

Université de Montréal

Coévolution des populations québécoises de cutérèbres (*Cuterebra grisea* et *Cuterebra fontinella*) et de souris du genre *Peromyscus* : la souris sylvestre (*P. maniculatus*) et la souris à pattes blanches (*P. leucopus*)

par

Sarah Noël-Boissonneault

Département de sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences biologiques

Novembre 2003

© Sarah Noël-Boissonneault, 2003



QH

302

U54

2004

v. 006

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Coévolution des populations québécoises de cutérèbres (*Cuterebra grisea* et *Cuterebra fontinella*) et de souris du genre *Peromyscus* : la souris sylvestre (*P. maniculatus*) et la souris à pattes blanches (*P. leucopus*)

présenté par
Sarah Noël-Boissonneault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Mme. Anne Bruneau	: président-rapporteur
M. Bernard Angers	: codirecteur
M. François-Joseph Lapointe	: codirecteur
M. Pierre-Paul Harper	: membre du jury

RÉSUMÉ FRANÇAIS

La présente étude porte sur deux espèces de diptères parasites (*Cuterebra grisea* et *Cuterebra fontinella*) et leurs hôtes respectifs, la souris sylvestre (*Peromyscus maniculatus*) et la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*). La difficulté d'identifier morphologiquement les deux espèces de parasites a motivé la première portion de mes travaux, soit le développement de deux techniques d'identification moléculaire. La première technique utilise l'amplification spécifique différentielle, alors que la seconde se base sur des sites de restriction. Les deux méthodes, testées sur des larves et des spécimens adultes de musée, se sont avérées très efficaces. La seconde portion de mon projet consiste en la comparaison de la structure des populations d'hôtes et de parasites. Des structures congruentes ont été obtenues pour *P. maniculatus* et *C. grisea* uniquement. Puisque les barrières à la dispersion ne sont pas les mêmes pour *C. grisea* et son hôte, cette congruence pourrait être due à la coévolution.

Mots clés français: ADN mitochondrial, amplification spécifique différentielle, diptères, hôte-parasite, hybridation, phylogéographie, spécimens de musées, structure génétique des populations.

RÉSUMÉ ANGLAIS

The present research concerns two species of parasitic Diptera (*Cuterebra grisea* and *Cuterebra fontinella*) and their hosts, the Deer Mouse (*Peromyscus maniculatus*) and the White-footed Mouse (*Peromyscus leucopus*), respectively. Because of the difficulty of morphological identification of adult and larvae of the two cryptic species of parasites, molecular identification techniques were developed. The first technique employs species-specific primers used in multiplex-PCR whereas the other relies on restriction fragment length polymorphism (RFLP). Both methods were tested on *Cuterebra* larvae and adult museum specimens and were shown to be reliable. The second portion of my work is a comparison of host and parasite population structure using mitochondrial sequences. Results showed congruence between the population structure of *P. maniculatus* and *C. grisea*, but not for the other host-parasite pair. Since geographical barriers are not the same for *C. grisea* and its host, this congruence may be due to coevolution.

Mots clés anglais : botflies, coevolution, genetic population structure, host-parasite, hybridization, mitochondrial DNA, museum specimens, phylogeography, RFLP, species-specific primers.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ FRANÇAIS	III
RÉSUMÉ ANGLAIS	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	X
REMERCIEMENTS	XII
CHAPITRE 1	1
1.1 Coévolution	2
1.1.1 Définitions	2
1.1.2 Relations hôtes-parasites	3
1.1.3 Coévolution intraspécifique	5
1.2 Les cutérébres	6
1.2.1 Position taxonomique	6
1.2.2 Caractères morphologiques	7
1.2.3 Identification de <i>Cuterebra grisea</i> et <i>C. fontinella</i>	7
1.2.4 Répartition géographique	8
1.2.5 Écologie	8
1.3 La souris sylvestre et la souris à pattes blanches	11
1.3.1 Position taxonomique	11
1.3.2 Caractères morphologiques	11
1.3.3 Identification de <i>Peromyscus maniculatus</i> et <i>P. leucopus</i>	11
1.3.4 Répartition géographique	13
1.3.5 Écologie	14

1.4 Relations hôtes-parasites	14
1.4.1 Spécificité.....	14
1.4.2 Cycle d'infestation.....	15
1.4.3 Effets chez l'hôte	17
1.4.4 Incidence	17
1.5 Intérêts du modèle <i>Cuterebra</i> / <i>Peromyscus</i>	18
1.6 Objectifs du projet de recherche.....	20
1.7 Méthodologie.....	20
1.7.1 ADN mitochondrial	20
1.7.2 Gènes mitochondriaux sélectionnés.....	21
1.8 Organisation du mémoire.....	22
CHAPITRE 2	23
2.0 Accord des coauteurs.....	24
2.1 Résumé	25
2.2 Abstract.....	26
2.3 Introduction	27
2.4 Materials and methods	28
2.4.1 Samples and DNA isolation	28
2.4.2 Sequencing	29
2.4.3 Species-specific primers design	31
2.4.4 RFLP	32
2.4.5 Evaluation of the molecular identification tools	32
2. 5 Results	32
2.5.1 Species-specific primers	32
2.5.2 RFLP	36
2.6 Discussion.....	36
2.7 Conclusion.....	38
2.8 Acknowledgments	39

CHAPITRE 3	40
3.0 Accord des coauteurs	41
3.1 Résumé	42
3.2 Abstract	43
3.3 Introduction	44
3.4 Materials and methods	46
3.4.1 Samples	46
3.4.2 Molecular analysis	47
3.4.3 Data analysis	48
3.5 Results	49
3.5.1 Prevalence and host specificity	49
3.5.2 <i>Cuterebra</i> sequences	53
3.5.3 <i>Peromyscus</i> sequences	55
3.5.4 Population differentiation and isolation-by-distance	55
3.5.5 Effect of the St. Lawrence River	56
3.5.6 Host-parasite relationships among populations	56
3.6 Discussion	57
3.7 Acknowledgments	59
CHAPITRE 4	61
4.1 Identification moléculaire des cutérèbres	62
4.2 Coévolution	63
4.3 Bilan et recherches futures	64
RÉFÉRENCES	66

LISTE DES TABLEAUX

Table 2-I Collection locality (with superscript numbers referring to Fig. 1) of <i>Cuterebra</i> larvae used to design specific markers and results of identification (ID) with sequencing, species-specific primers (Primers ID) and RFLP.....	34
Table 2-II Collection locality (with superscript numbers referring to Fig. 1) and collection date of adult museum specimens for which identification was obtained for molecular markers, and results of identification (ID) with morphological characters, sequencing, species-specific primers and RFLP.....	35
Table 3-I Number of hosts and parasites collected, with prevalence of parasitism in each region. Numbers in parentheses indicate the number of <i>Cuterebra</i> specimens for which sequences could be obtained. <i>Peromyscus sp.</i> indicates specimens for which identification with species-specific primers have not been done because these were not parasitized.....	50
Table 3-II Sequence lengths, number of variable sites, and number of informative sites of the mitochondrial genes sequenced in this study, for host and parasite species.	54

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1** Localités où des *Cuterebra grisea* (carrés) et des *Cuterebra fontinella* (cercles) ont été observés, superposées à l'aire de répartition de la souris sylvestre (aire rouge) et de la souris à pattes blanches (aire ombrée) (Modifié de Sabrosky 1986).....9
- Figure 1.2** Cycle vital d'un cutérèbre parasitant un rongeur (Adapté de Catts 1982). 16
- Figure 2.1** Collection locality of the *Cuterebra* larvae (n) and adult museum specimens (★, ☆) used in the present study. ☆ represent museum specimens that could not be identified with the molecular markers. The location numbers refer to Tables 1 and 2. ..30
- Figure 2.2** Results of PCR amplification using species-specific primers showing the *C. fontinella* band (170 bp) and the generic band (210 bp). Lanes 1, 3, 4, 6, 7, 10: *C. grisea*. Lanes 2, 8, 9: *C. fontinella*. Lane 5: 100 bp ladder size standard.33
- Figure 2.3** Results of the digestion of COI segment with *HapII* showing the intact 476 bp band for *C. fontinella* (lanes 1-3) and the two fragments of 160 bp and 315 bp for *C. grisea* (lane 4). Lane 5: 100 bp ladder size standard.37
- Figure 3.1** (A) Close-up of Abitibi region showing locations where *Cuterebra* were sampled. (B) Map of Québec showing the seven populations where *Cuterebra* were sampled. (C) Close-up of Haut St-Laurent region showing locations where *Cuterebra* were sampled. AB: Abitibi, DM: Deux-Montagnes, ES: Estrie, CA: Chaudière-Appalaches, HL: Haut St-Laurent, MA: Mauricie, SG: Saguenay.....51
- Figure 3.2** (A) Neighbor-joining tree of *Cuterebra* based on the total-evidence analysis of COI, COII and COIII sequences. (B) Neighbor-joining tree of *Peromyscus* estimated from COIII sequences. Numbers above branches indicate bootstrap support values (nodes with <50% bootstrap support were collapsed). A line between host and parasite is indicative of a mismatch according to host-specificity hypothesis. Names of specimens refer to abbreviations used in Figure 3.1.....52

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

°C	Degree Celsius
ADN	Acide désoxyribonucléique
bp	Base pairs
COI	Cytochrome oxidase I
COII	Cytochrome oxidase II
COIII	Cytochrome oxidase III
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates
g	Gramme
km	Kilomètre, kilometer
m	Mètre, meter
min	Minute
mM	Micromolar
µl	Microlitre
µM	Micromolar
nb.	Number
ng	Nanogram
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
sec	Second
U	Unit
UV	Ultraviolet

*pour Roland, mon grand-père
qui m'a ouvert tant de portes*

REMERCIEMENTS

Je voudrais en premier lieu exprimer toute ma gratitude à mon directeur de recherche, François-Joseph Lapointe. Je le remercie tout d'abord de m'avoir fait découvrir ces insectes fascinants que sont les *Cuterebra*, et de m'avoir proposé ce projet de maîtrise fait sur mesure. Je tiens également à le remercier pour son apport humain à ce projet: ses idées créatrices, sa grande disponibilité, son esprit critique et son enthousiasme ont grandement contribué à faire de ce projet une entreprise plus qu'agréable. Son support et ses encouragements à publier et à diffuser mes résultats ont aussi été particulièrement appréciés; merci aussi pour les kangourous!

Je voudrais également remercier mon deuxième directeur, Bernard Angers, pour sa confiance en moi. La porte de son labo toujours ouverte, ainsi que ses commentaires et conseils, parcimonieux mais toujours très pertinents, m'ont grandement aidé dans la réalisation de mon projet, tant au niveau technique que scientifique.

Je ne peux passer sous silence l'apport multidimensionnel de Nathalie Tessier à ce projet. Ses connaissances sans fin et sa grande aptitude à les transmettre m'ont permis de découvrir la laborantine en moi, et d'apprécier à leur juste valeur les joies de la biologie moléculaire! Son intérêt et son support à toutes les étapes de cette aventure, ainsi que son enthousiasme délirant m'ont permis d'apprécier grandement mon séjour du côté « mouillé ». Je tiens également à la remercier pour les excursions sur le terrain qui permettent de changer les idées et de refaire le plein de motivation.

Je suis également très reconnaissante envers tous les membres du labo avec qui j'ai partagé de longues heures de travail, mais surtout de bons moments de rire et des périodes de débilité salutaires! Merci à Anaïs, Anne-Marie, Catherine, Claudine, Olivier et Sébastien, sans oublier Nat et le Guru, pour votre support technique et moral. Le LEMEE ne serait pas ce qu'il est sans chacun d'entre vous.

Je voudrais remercier tout spécialement mon copain Pierre. Merci pour tes encouragements et ton support qui ont grandement facilité la traversée de nombreux creux de vague. Ton aide, autant sur le plan technique, scientifique ou moral, m'a été très précieuse. Je te suis infiniment reconnaissante pour ta présence réconfortante, ta compréhension infinie, tes sages conseils, tes bons mots et ton oreille attentive lors des moments de découragement. Je tiens également à t'exprimer toute ma gratitude pour ton intérêt envers mes réalisations, la confiance que tu portes en moi et ta présence à mes côtés pour partager les bons moments. Merci d'être là, simplement.

Finalement, je désire remercier les différents organismes subventionnaires qui ont contribué à la réalisation de ce projet : le Fonds Québécois de Recherches sur la Nature et les Technologies (FQRNT) et le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG).

« It is this interactive and iterative process that makes coevolution such a potentially powerful evolutionary process in shaping biodiversity. It may be the most important process organizing the diversity of life. »

John N. Thompson (1999)

« ...an estimate that parasitic insects represent close to half the animals on earth does not seem unrealistic...it is clear that parasitism as a way of life is more common than all other feeding strategies combined. »

Peter W. Price (1977)

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 COÉVOLUTION

1.1.1 Définitions

La coévolution a d'abord été définie comme étant l'existence de patrons d'interactions entre deux groupes d'organismes en relation écologique étroite (Ehrlich & Raven 1964). Cette définition assez vague englobe les concepts de coadaptation et cospéciation. La coadaptation est l'adaptation réciproque chez deux espèces en interaction (Thompson 1985). Un exemple classique de coadaptation se retrouve entre le Colibri porte-épée (*Ensifera ensifera*) qui a un très long bec adapté à l'éperon de plus de 10 cm de la passiflore (*Passiflora mixta*) (Feinsinger 1983 dans Futuyma & Slatkin 1983). La cospéciation consiste en des événements de spéciation apparus conjointement chez deux taxons en interaction (Moran & Bauman 1994, Hafner & Page 1995). Dans les cas de cospéciation entre hôtes et parasites par exemple, les topologies de la phylogénie des hôtes et de la phylogénie des parasites devraient être plus semblables que ce l'on s'attendrait à obtenir par hasard (Hafner *et al.* 1994).

Bien que la coadaptation et la cospéciation puissent être des indices de coévolution, Janzen (1980) souligne l'importance de la réciprocité du changement évolutif pour qu'il y ait véritable coévolution, c'est-à-dire que chaque organisme doit jouer un rôle dans l'évolution de l'autre avec lequel il est associé. Dans le cas de la coadaptation, deux espèces ont pu développer des structures indépendamment qui sont par hasard adaptées l'une à l'autre lorsque ces espèces se retrouvent en interaction. De la même manière, il peut y avoir eu spéciation conjointe chez deux groupes sans que cela ne soit dû à leur interaction, mais plutôt à des facteurs biogéographiques (Huelsenbeck *et al.* 2003).

Pour que l'on puisse réellement parler de coévolution, il ne suffit donc pas que les espèces soient adaptées l'une à l'autre ou qu'il y ait eu spéciation conjointe, il faut également que ces adaptations ou spéciations respectives résultent de changements apparus chez l'autre espèce. La définition du terme coévolution fut donc restreinte à l'évolution d'une espèce en réponse à un changement chez une espèce associée, lui-même causé par la modification

d'un trait chez la première espèce (Thompson 1982). Toutefois, puisqu'il peut être très difficile de démontrer la cause d'adaptations ou de spéciations, on considère généralement la coadaptation et la cospéciation comme étant des marques de coévolution, malgré la pertinence théorique de l'argumentation de Janzen (ex. Collette & Russo 1985, Hafner & Nadler 1988, Hafner & Page 1995).

1.1.2 Relations hôtes-parasites

Bien qu'il soit possible d'observer la coévolution dans les relations écologiques de type prédation, compétition, parasitisme, ou mutualisme (Thompson 1982), c'est surtout au niveau des interactions hôtes-parasites (au sens large incluant les plantes et les pathogènes), que le phénomène a été étudié (ex. Holmes 1983, May & Anderson 1983, Barrett 1985, Traub 1985, Hafner & Nadler 1988, Hart 1988). L'hypothèse voulant que les hôtes et les parasites soient si étroitement liés que leurs phylogénies et leurs distribution géographiques devraient être concordantes a donné lieu à une série de règles qui définissent la coévolution entre les hôtes et les parasites (Brooks 1979).

La plus connue de ces règles est sans doute celle de Fahrenholz qui stipule que la phylogénie des parasites correspond à celle des hôtes et que leurs topologies concordent (Barret 1985). Cette règle est fondée sur la prémisse que les ancêtres des parasites actuels ont dû parasiter les ancêtres des hôtes actuels et qu'il y a eu cospéciation (Mitter & Brooks 1983). Un exemple classique de ce phénomène se retrouve chez les poux des genres *Geomydoecus* et *Thomomydoecus* dont la phylogénie est l'image miroir de leurs hôtes, les gaufres (rongeurs: Geomyidae) (Hafner & Nadler 1988, Hafner *et al.* 1994, Hafner & Page 1995, Page 1996). La règle de Szidat veut que les parasites les plus primitifs soient associés aux hôtes les plus primitifs (Mitter & Brooks 1983). Il s'agit donc d'un cas précis de la règle de Fahrenholz qui a été appliqué à certains champignons parasites (*Uredinopsis*) des plantes vasculaires. Selon cette règle, les champignons parasitant les fougères sont plus primitifs que ceux qui parasitent les conifères et ces deux groupes sont plus primitifs que

les champignons s'attaquant aux plantes supérieures, telles que les angiospermes (Hart 1988).

La règle de Eichler énonce qu'un groupe d'hôtes diversifié en termes d'espèces comptera plus d'espèces de parasites qu'un groupe d'hôtes de même niveau taxonomique, mais moins diversifié (Hart 1988). Cette règle repose sur l'hypothèse de la spéciation conjointe. Par exemple, selon cette règle les rongeurs qui forment l'ordre de mammifères le plus diversifié avec 1752 espèces devraient servir d'hôtes à un plus grand nombre d'espèces de parasites que l'ordre des primates qui ne compte que 180 espèces (Anderson & Jones 1984).

Finalement, les trois règles de Manter ont été élaborées. La première stipule que les parasites évoluent plus lentement que les hôtes, puisqu'ils en sont dépendants. En effet, la spéciation des parasites devrait se faire suite à celle des hôtes en raison de l'isolement reproducteur ainsi créé. La deuxième règle de Manter veut que plus l'association hôte-parasite est vieille, plus la spécificité des parasites sera élevée puisque ceux-ci auront eu le temps de s'adapter et se spécialiser pour infester de manière plus efficace un nombre réduit d'hôtes. La troisième règle stipule que si deux espèces d'hôtes proches ayant des distributions disjointes possèdent les mêmes parasites, c'est que les zones géographiques qu'ils habitent ont déjà été contiguës (Mitter & Brooks 1983). Cette règle repose sur le fait qu'il est plus parcimonieux de supposer une même origine géographique que l'apparition indépendante des mêmes parasites.

Outre les règles précédemment mentionnées, les relations écologiques de type parasitisme ont également été utilisées pour développer des théories de la coévolution, en particulier la théorie gène-pour-gène. Selon cette dernière, pour chaque gène de résistance chez l'hôte on retrouve un gène de virulence chez le parasite (Parlevliet 1985). Selon les génotypes retrouvés chez l'hôte et le pathogène aux locus respectifs de résistance ou de virulence impliqués, il y aura infestation ou non. Le système gène-pour-gène a été observé dans plus de 28 interactions entre des plantes et des pathogènes (Thompson 1989). Chez les animaux,

des expériences en laboratoire sur des souris (*Mus musculus*) et des vers parasites (*Trypanosoma congolense*) portent à croire que plusieurs locus seraient impliqués dans un système multigènes contrôlant la résistance et la virulence des hôtes et des parasites (Sorci *et al.* 1997). Un modèle plus précis a ensuite été développé: le modèle des allèles correspondants (matching-allele) qui stipule que chaque allèle de résistance de l'hôte correspond à un seul allèle de virulence chez le parasite (Frank 1993).

1.1.3 Coévolution intraspécifique

Jusqu'à présent, il n'a été question que de coévolution entre des espèces, ou encore au niveau supraspécifique. Mais la coévolution peut aussi agir au niveau intraspécifique, soit au niveau des populations. On a, par exemple, observé que des parasites présentaient des adaptations locales aux caractéristiques particulières de leur population hôte, en particulier en ce qui a trait à la pathogénicité (Gandon *et al.* 1996). La structure génétique des populations de l'hôte peut influencer celle des parasites. L'hôte constituant une ressource vitale pour le parasite, la structure de population de ce dernier devrait refléter son association obligatoire avec l'hôte (Mulvey *et al.* 1991). Ainsi, on devrait s'attendre à ce que les relations évolutives des populations des parasites reflètent celles des hôtes lorsque la dispersion des individus et l'extinction des populations sont liées chez les deux espèces (Parker & Spoerke 1998).

Quelques études ont testé cette hypothèse (Michalakis *et al.* 1993, Dybahl & Lively 1996, Parker & Spoerke 1998, Althoff & Thompson 1999, Martinez *et al.* 1999), mais peu l'ont vérifiée. Dans certains cas, cela pourrait être attribuable au choix des espèces étudiées. Par exemple, il est évident que la dispersion, et ainsi la structure génétique et géographique, d'un parasite ayant plusieurs hôtes successifs ne sera pas déterminée uniquement par l'hôte primaire (premier hôte impliqué dans le cycle vital du parasite) ou définitif (dernier hôte du cycle du parasite) (Mulvey *et al.* 1991, Dybdahl & Lively 1996). Aussi, dans le cas du parasitisme du couvain où le Coucou geai (*Clamator glandarius*) pond ses œufs dans le nid de la Pie bavarde (*Pica pica*) qui élèvera les jeunes de l'espèce parasite aux dépens des siens, les patrons de migration et de dispersion des hôtes et des parasites peuvent être

extrêmement différents et empêcher la coévolution (Martinez *et al.* 1999). À ma connaissance, une seule étude a réussi à démontrer la congruence de la structure des populations de deux espèces en interaction, soit une relation de mutualisme entre la légumineuse *Amphicarpaea bracteata* et les bactéries fixatrices d'oxygène du genre *Bradyrhizobium* (Parker & Spoerke 1998).

La coévolution intraspécifique ne semble donc pas avoir été observée dans une relation de type hôte-parasite à ce jour. Les travaux présentés dans ce mémoire abordent cette problématique chez les mouches du genre *Cuterebra* parasitant la souris sylvestre (*Peromyscus maniculatus*) et la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*).

1.2 LES CUTÉRÈBRES

1.2.1 Position taxonomique

Les cutérèbres sont des diptères supérieurs faisant partie de la famille des Oestridae. Cette famille regroupe les diptères dont les stades larvaires sont des parasites obligatoires de divers mammifères et causent des myases. Telle que définie par Zumpt (1965), une myase consiste en "l'infestation de vertébrés vivants par des larves de diptères qui, au moins pour une certaine période, se nourrissent de tissus ou de fluides corporels de l'hôte ou encore de nourriture ingérée par ce dernier".

Si certains auteurs les classent dans une famille à part entière appelée Cuterebridae (Catts 1982, Sabrosky 1986), les cutérèbres sont généralement considérées comme formant une des quatre sous-familles d'Oestridae: les Cuterebrinae (Wood 1981, Pape 2001, Otranto *et al.* 2003). Comprenant 83 espèces réparties en six genres, cette sous-famille est uniquement retrouvée dans le Nouveau-Monde. On y retrouve des parasites de petits rongeurs, de lagomorphes, de primates, de bétail ainsi qu'un parasite de l'homme, *Dermatobia hominis* (Catts 1982).

1.2.2 Caractères morphologiques

Les mouches du genre *Cuterebra* sont relativement grandes et mesurent de 13 mm à 27 mm de longueur. Les femelles sont généralement plus grandes et robustes que les mâles. Les cutérébres possèdent de petites antennes et leurs pièces buccales sont compactes et non fonctionnelles chez les adultes qui ne peuvent se nourrir (Wood 1981). Le mésonotum (portion dorsale du deuxième segment thoracique) et les pattes sont densément couverts de poils qui sont parfois utilisés comme critères d'identification (Sabrosky 1986).

Les stades larvaires sont au nombre de trois. Les larves de premier stade sont blanches et ont des mandibules relativement bien développées. À chaque mue, la larve devient plus foncée et celle du troisième stade est brune ou même noire. Le dernier stade larvaire est presque complètement recouvert de petites épines aplaties qui limiteraient la dessiccation ou encore qui joueraient un rôle de protection physique (Wood 1981).

1.2.3 Identification de *Cuterebra grisea* et *C. fontinella*

Cuterebra grisea et *C. fontinella* sont deux espèces-sœurs vivant en sympatrie au Québec et qui sont très difficiles à distinguer morphologiquement. Les deux seuls critères sont la présence d'une tache noire sur le mésopleure (région latérale du deuxième segment thoracique) de *C. fontinella* et la couleur des poils sur le mésoscutum (sclérite médian du deuxième segment thoracique) qui est plutôt noire chez *C. fontinella* et jaune chez *C. grisea*. Toutefois, des formes intermédiaires présentant des caractères morphologiques propres aux deux espèces ont été observées en nature. De plus, une colonie de *C. fontinella* élevée en laboratoire a produit des formes typiques des deux espèces ainsi que des formes intermédiaires. Ces observations remettent en question le statut d'espèce attribué à *C. grisea* et *C. fontinella* et illustrent les difficultés d'identification morphologique de ces espèces. D'ailleurs, certains auteurs considèrent que *C. grisea* est en fait une sous-espèce de *C. fontinella* et devrait plutôt être appelée *C. fontinella grisea* (Sabrosky 1986). Par contre, leur distribution géographique et les hôtes des deux espèces étant différents (voir section

1.2.4 et 1.2.5), d'autres auteurs leur accordent le statut d'espèces distinctes (Hunter *et al.* 1972, Boonstra *et al.* 1980).

La confusion et le manque d'information quant aux critères d'identification de ces deux espèces, ou sous-espèces, pourraient être attribuables au fait que les adultes sont rarement observés en nature (Wood 1981). On connaît donc peu les variations phénotypiques de chaque espèce. De plus, il est pratiquement impossible d'identifier les larves en se basant sur des caractères morphologiques, celles-ci doivent donc être élevées en laboratoire pour rendre l'identification possible (Sabrosky 1986). Ces difficultés d'identification se répercutent dans la littérature où l'on retrouve plusieurs publications où l'espèce de cutérébre sur laquelle porte l'étude n'a pu être identifiée (ex. Sealander 1961, Goertz 1966, Miller & Getz 1969, Clark & Kaufman 1990, Galindo-Leal 1997).

1.2.4 Répartition géographique

La distribution géographique de *Cuterebra grisea* couvre tout le Canada et descend au sud jusqu'en Utah et au New Jersey. Des observations ont été recensées pour toutes les provinces et territoires canadiens à l'exception du Yukon, du Nunavut, de l'Île-du-Prince-Édouard, du Nouveau-Brunswick et de Terre-Neuve (Sabrosky 1986). L'aire de distribution de *C. fontinella* s'étend du sud du Canada jusqu'au nord-est du Nouveau-Mexique et couvre tous les États-Unis, à l'exception de l'Alaska et d'Hawaï. Ces deux espèces vivent donc en sympatrie au sud du Canada et au nord des États-Unis (Figure 1.1).

1.2.5 Écologie

L'habitat des cutérébres est peu connu, en raison de la difficulté à les observer hors des sites d'agrégation où les mâles se regroupent en période de reproduction et défendent un territoire (Hunter & Webster 1973a). Lorsque les femelles vierges passent à proximité de leur territoire, les mâles les reconnaissent par leur patron de vol qui est distinct de celui des femelles déjà accouplées (Catts 1982). Les femelles sont alors happées en vol par les mâles pour copuler. Les composantes des sites d'agrégation diffèrent selon les espèces:

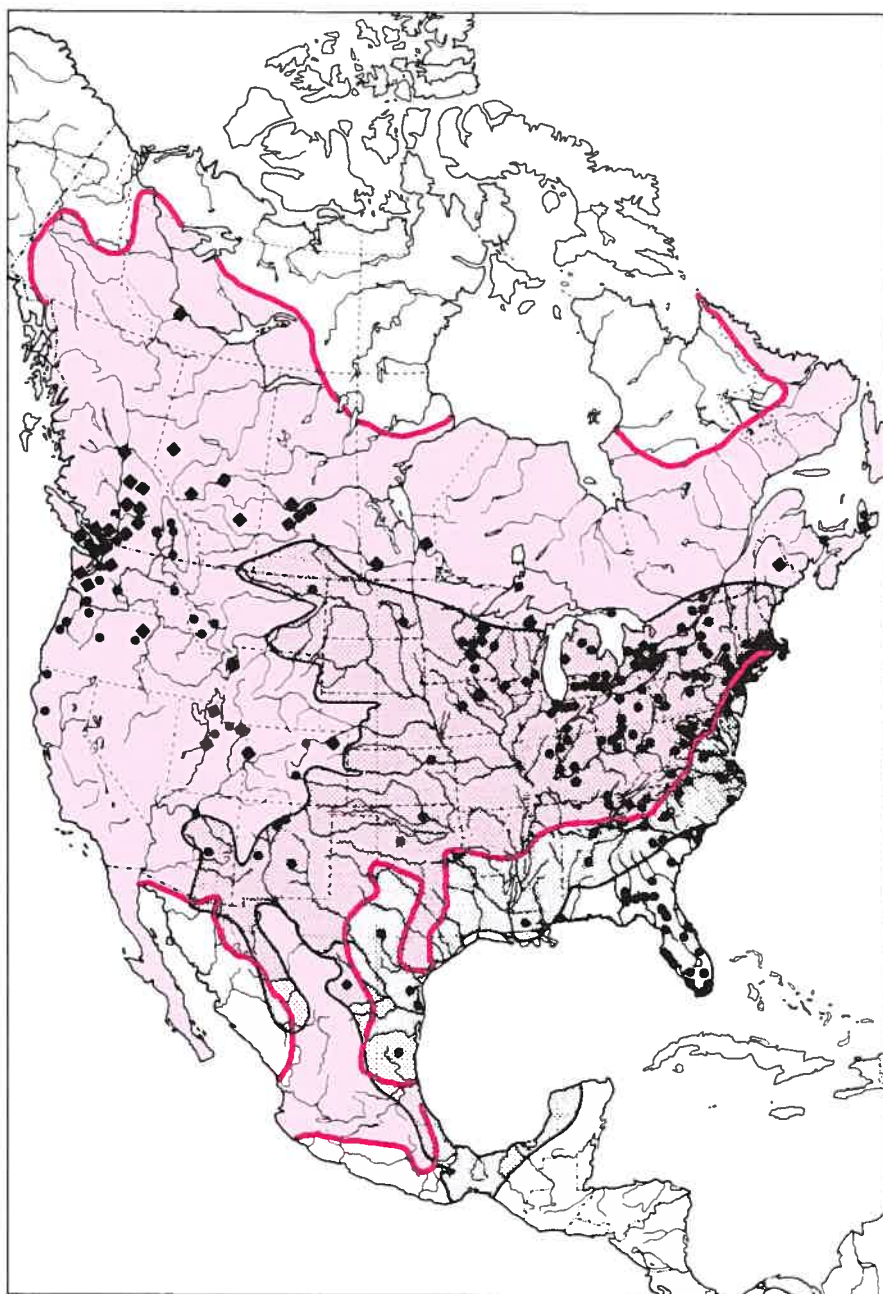


Figure 1.1 Localités où des *Cuterebra grisea* (carrés) et des *Cuterebra fontinella* (cercles) ont été observés, superposées à l'aire de répartition de la souris sylvestre (aire rouge) et de la souris à pattes blanches (aire ombrée) (Modifié de Sabrosky 1986).

chez *C. fontinella*, un site a été répertorié dans une prairie de graminées près d'un petit ruisseau (Shiffer 1983), alors que chez *C. grisea*, les sites d'agrégation sont parfois situés aux bords des routes (Hunter & Webster 1973a). Bowman (2000) rapporte que la présence des cutérèbres est particulièrement élevée dans les forêts de bois mou avec de nombreux débris de bois au sol. Les débris procurant aux micro-mammifères un habitat de choix, il s'agit là d'un site approprié pour la ponte des œufs des cutérèbres (Bowman 2000). Il a également été observé que les souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) sont plus parasitées dans les 45 premiers mètres de la bordure forestière qu'en pleine forêt (Wolf & Batzli 2001). Cela pourrait être dû à la plus grande pénétration de la lumière dans les lisières puisque les cutérèbres préfèrent les endroits ensoleillés pour les sites d'agrégation.

Les adultes ne se nourrissant pas, toute l'énergie nécessaire au maintien et à la reproduction est accumulée par les stades larvaires. L'hôte parasité par la larve constitue donc la ressource alimentaire principale. Alors que *C. grisea* infeste normalement la souris sylvestre (*Peromyscus maniculatus*), *C. fontinella* parasite habituellement la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*). Ces espèces de cutérèbres peuvent également parfois infester des hôtes inhabituels tels que des chats (Harris *et al.* 2000), des chiens (Crawley 1923) et même l'homme (Keth 1999, Safdar *et al.* 2003)

Les habitudes de dispersion des cutérèbres ne sont pas connues. Comme tous les Oestridae, il s'agit de grosses mouches au vol puissant. Il a été observé qu'une espèce d'Oestridae, *Hypoderma tarandi*, a une capacité de vol de 220 à 900 km et peut effectuer des déplacements de l'ordre de 20 à 40 km en une période de 6 à 35 heures (Nilssen & Anderson 1995). Cette aptitude à la dispersion ne peut toutefois pas être postulée pour tous les Oestridae puisqu'il s'agit probablement d'une adaptation spécifique au comportement migratoire de leur hôte, le caribou (*Rangifer tarandus*), qui peut se déplacer de plus de 100 km en une seule journée. Puisque les adultes des espèces *C. grisea* et *C. fontinella* ne vivent que quelques jours et que leur vie est essentiellement consacrée à la reproduction (Wood 1981), il semble plus raisonnable de penser que leurs aptitudes à la dispersion sont beaucoup plus limitées que celles de *H. tarandi*.

1.3 LA SOURIS SYLVESTRE ET LA SOURIS À PATTES BLANCHES

1.3.1 Position taxonomique

La souris sylvestre et la souris à pattes blanches sont des rongeurs faisant partie de la famille des Muridae. Avec au moins 1326 espèces réparties en plus de 281 genres (Michaux *et al.* 2001) retrouvées sur tous les continents (Corbet & Hill 1991), il s'agit de la famille de mammifères la plus diversifiée (Nowak & Paradiso 1983). On y retrouve les rats, souris, hamsters, campagnols, lemmings et gerbilles.

Le genre *Peromyscus* appartient aux Sigmodontinae, une des 17 sous-familles de Muridae qui regroupe les rats et les souris du Nouveau-Monde (McKenna & Bell 1997). On le retrouve en Amérique du Nord et en Amérique Centrale (Corbet & Hill 1991) dans une très grande diversité d'habitats allant du désert à la forêt tropicale, en passant par la taïga et la prairie (Blair 1950). Cette grande variété d'habitats a permis plusieurs événements de spéciation et l'on retrouve aujourd'hui pas moins de 53 espèces du genre *Peromyscus* (Wilson & Cole 2000).

1.3.2 Caractères morphologiques

Les souris du genre *Peromyscus* mesurent de 70 mm à 170 mm, queue comprise. La masse de l'adulte varie de 10 g chez les petites espèces nordiques comme *P. maniculatus* à plus de 110 g chez quelques espèces tropicales. Le pelage est de couleur très variable, allant du brun très foncé jusqu'au blanc, et est habituellement pâle ventralement chez la plupart des espèces. Les oreilles sont relativement grandes par rapport au reste du corps et la queue mesure au moins le tiers de la longueur corporelle (Nowak & Paradiso 1983).

1.3.3 Identification de *Peromyscus maniculatus* et *P. leucopus*

La souris sylvestre et la souris à pattes blanches se ressemblent beaucoup. L'identification morphologique se base principalement sur la queue qui, chez la souris sylvestre, est normalement aussi longue ou plus longue que le corps, blanchâtre ventralement et possède

un pinceau de poils à son extrémité. Chez la souris à pattes blanches, la queue est habituellement plus courte que le corps, plus foncée ventralement et possède rarement un pinceau de poils (Choate 1973). Quoique ces critères d'identification soient encore parfois utilisés, ils sont en général considérés comme étant peu fiables (Waters 1962, Rich *et al.* 1996) étant donné la grande variabilité des phénotypes pouvant changer significativement entre des populations séparées de quelques kilomètres (Blair 1950). D'ailleurs, l'utilisation de ces critères n'a permis d'identifier correctement que 55% des individus lors d'une étude de Rich *et al.* (1996).

Des techniques alternatives furent donc développées pour pallier à ces problèmes d'identification. La première méthode utilisée fut un test immunologique d'agglutination des globules rouges (Moody 1941). Puis, avec l'avènement des techniques de caryotypes, le nombre de chromosomes métacentriques, sub-métacentriques et acrocentriques fut utilisé pour différencier les espèces (Singh & McMillan 1966, George & Bradshaw 1968, Bowers *et al.* 1973). Des critères morphologiques intégrant plusieurs mesures craniométriques dans des modèles d'analyse discriminante ont également été utilisés (Choate 1973, Rich *et al.* 1996). Toutes ces méthodes permettent efficacement de distinguer les deux espèces de *Peromyscus*. Toutefois, la prise de sang nécessaire pour les tests immunologiques et les caryotypes réduit la durée de vie des souris (Gaines *et al.* 1978) et les mesures craniométriques exigent que les spécimens soient sacrifiés. Une méthode basée sur l'électrophorèse de l'amylase salivaire a donc été développée pour remédier à ces problèmes (Aquadro & Patton 1980). Il s'agit encore aujourd'hui de la méthode privilégiée pour l'identification de *P. maniculatus* et *P. leucopus*. Récemment, une autre méthode permettant de distinguer ces deux espèces fut développée (Tessier *et al.* soumis). Celle-ci utilise l'amplification spécifique différentielle de gènes mitochondriaux par réaction de polymérase en chaîne (PCR). Les avantages de cette technique par rapport à l'électrophorèse salivaire sont nombreux: (1) les échantillons n'ont pas à être conservés sur glace, (2) les spécimens préservés dans l'éthanol peuvent être identifiés (3) tous les types de tissus sont utilisables (poils, muscle, foie) et (4) des spécimens de musées dont l'identification n'est pas confirmée peuvent être identifiés par cette méthode.

Bien que la souris à pattes blanches et la souris sylvestre soient très similaires morphologiquement, ce ne sont pas des espèces sœurs. Le genre *Peromyscus* est constitué d'espèces très semblables et subdivisées en 7 groupes rassemblant les espèces les plus proches. Or, *P. maniculatus* et *P. leucopus* se retrouvent dans deux groupes différents. L'espèce sœur de la souris sylvestre est *P. polionotus*, alors qu'il s'agit de *P. gossypinus* pour la souris à pattes blanches. Si les espèces du même groupe peuvent habituellement produire des hybrides en laboratoire (Blair 1950), la souris sylvestre et la souris à pattes blanches en sont incapables (Wolff 1985a)

1.3.4 Répartition géographique

Avec plus de 55 sous-espèces (Wilson & Ruff 1999), dont huit se retrouvent dans l'est du Canada (Peterson 1966), la souris sylvestre se retrouve d'une côte à l'autre du continent américain et ce, du Yukon jusqu'au sud des États-Unis. Il s'agit du petit mammifère indigène ayant la plus grande répartition géographique en Amérique du nord (Hooper 1968). Au Québec, on retrouve cinq sous-espèces de souris sylvestre. *Peromyscus m. maniculatus* se retrouve au nord du 50^e parallèle, *P. m. gracilis* vit au sud de ce même parallèle, *P. m. plumbeus* est restreinte à la côte nord à l'est du Saguenay, l'Île d'Anticosti abrite *P. m. anticostiensis* et *P. m. abietorum* est retrouvée dans la péninsule gaspésienne (Hall & Kelson 1959, Peterson 1966).

La souris à pattes blanches, qui comprend 17 sous-espèces (Wilson & Ruff 1999), se retrouve quant à elle à l'est du continent américain, soit de la côte Atlantique jusqu'au Montana et à l'Arizona. Sa limite septentrionale se situe à l'extrême sud de la province de Québec et on la retrouve jusqu'au sud du Mexique (Wilson & Ruff 1999). La souris sylvestre et la souris à pattes blanches partagent donc une grande zone de sympatrie comprenant le sud du Québec (Figure 1.1). Au Québec on retrouve uniquement la sous-espèce *P. l. noveboracensis* (Peterson 1966).

1.3.5 Écologie

La souris sylvestre se retrouve dans une grande variété d'habitats selon la sous-espèce et est très encline à loger dans les habitations humaines (Forsyth 1999). Au Québec, on la retrouve habituellement dans les zones boisées (Peterson 1966). La souris à pattes blanches habite également les endroits où le couvert forestier est relativement important, quoiqu'elle explore parfois aussi les zones ouvertes le long des bordures forestières (Peterson 1966).

La souris sylvestre et la souris à pattes blanches ont une diète similaire et consomment plusieurs espèces de fruits, de noix, et de fleurs. Il s'agit d'opportunistes dévorant pratiquement tout ce qu'ils trouvent, incluant des invertébrés, des salamandres et des œufs d'oiseaux lorsqu'elles en ont l'occasion (Forsyth 1999, Wilson & Ruff 1999).

Ce sont des animaux plutôt sédentaires ayant un domaine vital d'environ un hectare (Furrer 1973). La dispersion des individus se fait principalement au printemps et à l'automne et elle est plus élevée chez les mâles (Wolff 1985b, Fairbain 1977). La distance de dispersion est la plupart du temps inférieure à 200 m (Howard 1949), mais peut aller exceptionnellement jusqu'à 5 km (Van Horne 1981). La capacité de dispersion à la nage est relativement importante et certains individus peuvent nager plus de 230 m. Toutefois, la terre doit être visible pour que les individus nagent, ce qui porte à croire qu'ils s'orientent visuellement (Sheppe 1965).

1.4 RELATIONS HÔTES-PARASITES

1.4.1 Spécificité

La spécificité (nombre d'hôtes différents pour une seule espèce de parasite) des cutéribres est peu documentée. En ce qui concerne *C. grisea*, son hôte habituel est reconnu comme étant la souris sylvestre. Des observations ont aussi été reportées chez la souris à pattes blanches, le campagnol des champs (*Microtus pennsylvanicus*), le campagnol d'Oregon (*M. oregoni*), le campagnol de Townsend (*M. townsendii*), le tamia (*Tamias sp.*) et la souris-sauteuse des champs (*Zapus hudsonius*) (Sabrosky 1986). Du côté de *C. fontinella*

qui parasite normalement la souris à pattes blanches, des mentions ont également été obtenues pour la souris sylvestre, la souris des cotonniers (*Peromyscus gossypinus*), la souris de Nuttall (*Ochrotomys nuttalli*), la souris-à-abajoues du Mexique (*Liomys irroratus*), la souris sauteuse des bois (*Napaeozapus insignis*), la souris-à-sauterelles (*Onychomys leucogaster*) et le tamia amène (*Tamias amoenus*) (Sabrosky 1986). Toutefois, puisqu'il s'agit pour la plupart de larves de cutérèbres ayant été découvertes chez ces rongeurs puis élevées en laboratoire pour fins d'identification, il demeure impossible de savoir si, dans des conditions naturelles, ces larves parviennent à se développer normalement et atteignent la maturité chez ces hôtes. Pour vérifier s'il s'agit d'hôtes anormaux, des introductions artificielles de *C. fontinella* chez la souris à pattes blanches et la souris sylvestre ainsi que chez le campagnol des champs et le campagnol à dos roux de Gapper (*Clethrionomys gapperi*) ont été effectuées par D.M. Wood (Shiffer 1983). Les larves se sont développées jusqu'à maturité uniquement chez la souris à pattes blanches, indiquant ainsi que seule cette espèce constitue l'hôte naturel de *C. fontinella*. Il faut toutefois mentionner que le nombre d'individus infestés était trop faible pour évaluer statistiquement les différences observées. De plus, cette expérience ne nous renseigne absolument pas sur la spécificité de la relation hôte-parasite chez *C. grisea*.

1.4.2 Cycle d'infestation

Le cycle vital des cutérèbres est illustré à la Figure 1.2. Suite à l'accouplement, la femelle pond de 1000 à 2500 œufs en une vingtaine d'endroits sur le sol ou la végétation, dans des sites fréquentés par l'hôte (Catts 1982). La chaleur corporelle d'un hôte potentiel passant à proximité des œufs les fait éclore et le premier stade larvaire infeste l'hôte par les yeux, la bouche, le nez, l'anus ou encore par une lacération de la peau. Après une migration sous-cutanée, la larve arrive au stade de développement final quatre ou cinq jours après l'infestation et y complète son développement en 20 à 25 jours (Hunter 1973). À cet endroit, qui est très souvent en position inguinale, on peut observer une perforation de la peau de l'hôte qui sert de pore respiratoire. Ce pore s'agrandit pour former une cavité sous-cutanée où repose la larve formant une grosse protubérance. Les ressources énergétiques de

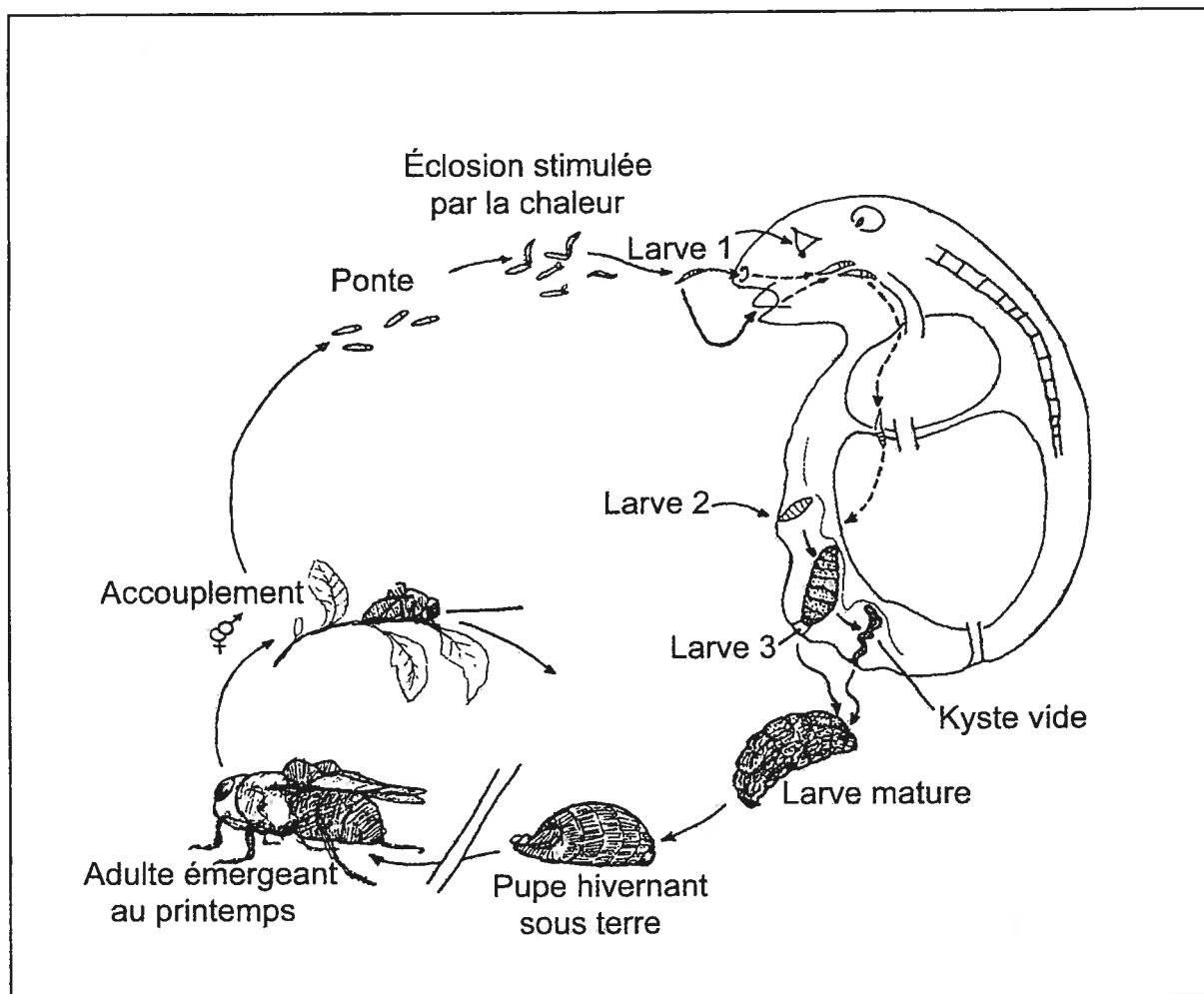


Figure 1.2 Cycle vital d'un cutanébre parasitant un rongeur (Adapté de Catts 1982).

la larve proviennent des tissus, mucus et sang qu'elle absorbe (Zumpt 1965). Arrivée à maturité, la larve compte pour 20% de la masse de l'animal (Payne & Cosgrove 1966) et atteint une taille d'environ 2,5 cm. Le troisième stade larvaire mature s'extrait de l'hôte et tombe au sol où il s'enfonce rapidement pour effectuer sa pupation. Normalement, la cavité alors vide se cicatrise et se referme rapidement sans complication (Payne & Cosgrove 1966). Les adultes passent l'hiver sous forme de pupe et émergent au printemps suivant (Catts 1982).

1.4.3 Effets chez l'hôte

Les effets du parasitisme des cutérèbres ne sont pas clairement connus. Hunter & Webster (1974) rapportent une composition sanguine caractéristique d'une carence en protéines probablement due à la grande quantité de tissus qu'absorbe la larve lors de son développement. Ils rapportent que cette anémie ne semble pas affecter la survie de l'hôte. Par ailleurs, des études portant sur *C. fontinella* et la souris à pattes blanches dénotent chez les individus infestés des testicules non descendus (Wecker 1962) ou plus petits (Timm & Cook 1979), de l'anémie (Sealander 1961, Dunaway *et al.* 1967), une augmentation de la taille de la rate (Timm & Cook 1979), ainsi qu'une entrave à la mobilité et la reproduction liée à la position généralement inguinale de la cavité sous-cutanée (Wecker 1962). D'autre part, certaines études ne notent aucun impact du parasitisme sur la reproduction et la survie des individus parasités (Timm & Cook 1979, Munger & Karasov 1991). Il semble toutefois raisonnable de penser que les capacités de reproduction, de dispersion et de fuite, particulièrement chez les individus souffrant d'infestations multiples, seront affectées. On peut alors croire qu'une forte présence de cutérèbres pourra avoir des conséquences au niveau de la génétique et de la dynamique des populations de *Peromyscus*.

1.4.4 Incidence

Le parasitisme des souris sylvestres est un phénomène relativement courant puisqu'on rapporte des taux d'infestation de 2% à 35% dans les populations naturelles (Hunter *et al.* 1972, Bowman 2000). On ne connaît pas exactement l'ampleur du parasitisme des cutérèbres chez la souris sylvestre et la souris à pattes blanches au Québec. Lors de captures

de souris sylvestres effectuées en Abitibi en 1995 et 1997 sur les îles du lac Duparquet, 71 individus sur 384 étaient parasités (18%). Certaines populations avaient un taux d'infestation aussi élevé que 50%, alors que dans d'autres populations aucun cutérébre n'a été détecté chez les souris. En 1998, les captures de souris sylvestres dans les îlots forestiers autour du lac Duparquet ont révélé une incidence de parasitisme plus faible, soit de 8% (Lapointe *et al.*, données non publiées). Cette différence pourrait être attribuable à une plus grande occurrence de parasitisme sur les îles, ou encore aux variations annuelles des taux d'infestation. En effet, des études portant sur les mêmes populations rapportent des variations annuelles de l'occurrence de 7,4% à 16% chez la souris sylvestre (Hunter *et al.* 1972) et de 19% à 33% chez la souris à pattes blanches (Dunaway *et al.* 1967). Dans la MRC du Haut Saint-Laurent, le taux d'infestation en 1998 et 1999 était respectivement de 3,6% et 10% avec encore une fois des populations où les parasites semblaient complètement absents (Lapointe *et al.*, données non publiées). Quoique montrant une forte présence des cutérébres, ces données ne permettent toutefois pas de savoir si ces diptères sont présents sur toute l'aire de répartition des souris sylvestres et des souris à pattes blanches au Québec.

Chez la plupart des souris infestées, une seule larve est retrouvée. Toutefois, selon la population, de 1% à 30% des individus sont parasités par deux ou plusieurs larves (Sealander 1961, Wecker 1962), pouvant même aller jusqu'à huit chez un seul individu (Munger & Karasov 1991). Les captures effectuées en Abitibi ont montré que la plupart des souris ont un seul parasite et que 18% en portent deux (Lapointe *et al.*, données non publiées).

1.5 INTÉRÊTS DU MODÈLE *CUTEREBRA* / *PEROMYSCUS*

L'étude de coévolution intraspécifique qui est le sujet de ce mémoire aurait pu être réalisée avec pratiquement n'importe quels organismes ayant une relation de parasitisme. Toutefois, plusieurs caractéristiques des souris et des cutérébres en font des objets d'études intéressants. Premièrement, les cutérébres n'ont pas d'hôtes intermédiaires pouvant interférer dans leurs relations avec les souris. Les distances de dispersion des cutérébres ne

sont pas connues, mais tout porte à croire qu'elles sont relativement limitées, probablement comparables à celles de petits mammifères. De plus, la dispersion des souris implique nécessairement celle des cutérèbres lorsque la souris est parasitée.

Tel que mentionné par Janzen (1980), la réciprocité de l'influence est une composante importante de la coévolution. Dans le cas des populations de cutérèbres et de souris, la présence d'une espèce agit sur la structure de populations de l'autre. En effet, les souris représentant une ressource indispensable pour les cutérèbres, la survie ou l'extinction de populations, leur démographie, et ainsi leur diversité génétique sont intimement liées aux caractéristiques des populations de leur hôte. La structure des populations des souris est également influencée par la présence de cutérèbres puisque l'infestation peut réduire les capacités de dispersion, de reproduction et de fuite des souris parasitées (Wecker 1962, Timm & Cook 1979) et ainsi modifier la structure des populations.

Pour comparer la structure des populations des hôtes et des parasites, il est nécessaire qu'une certaine structure soit présente à l'échelle envisagée, soit le Québec dans le cas présent. En ce qui concerne la souris sylvestre, une différenciation des populations a été observé à une échelle microgéographique (<20 km) (Landry 2000). Bien que cette étude porte sur des populations insulaires et ait été réalisée avec des marqueurs génétiques différents de ceux employés ici (voir section 1.7.1), il y a peu de doutes quant à la différenciation des populations à plus grande échelle. À ma connaissance, aucune étude portant sur la structure des populations de cutérèbres n'a été réalisée. Par contre, quelques espèces d'Oestridae parasites ont montré un certain niveau de différenciation des populations (Wagner 2000).

Finalement, l'étude du système *Cuterebra* / *Peromyscus* est stimulante intellectuellement puisque les connaissances au niveau de cette relation sont très partielles. De plus, il s'agit de la première étude de phylogéographie portant sur des cutérèbres.

1.6 OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

La présente étude comporte deux objectifs principaux. Dans un premier temps, les travaux réalisés visent à développer une méthode fiable permettant de distinguer les espèces *C. grisea* et *C. fontinella*. Les adultes de ces espèces montrant des problèmes d'identification morphologiques et les larves étant pratiquement impossibles à identifier, la création d'outils d'identification moléculaire représente une priorité pour l'étude des cutérèbres.

Dans un deuxième temps, il s'agit d'acquérir de l'information quant à la relation de parasitisme entre les cutérèbres et les souris du genre *Peromyscus* dans un contexte coévolutif. Ainsi, les questions suivantes seront abordées: quel est le degré de spécificité des cutérèbres ? Un modèle d'isolement par la distance peut-il expliquer les différences génétiques entre les individus pour les hôtes et les parasites? Les relations entre individus sont-elles les mêmes chez les hôtes et les parasites? Cette problématique sera envisagée dans un contexte de phylogéographie qui consiste en l'étude des principes et processus gouvernant la distribution géographique des lignées évolutives (Avisé 1994).

1.7 MÉTHODOLOGIE

1.7.1 ADN mitochondrial

Pour établir les relations génétiques entre les espèces, populations et individus à l'étude, des séquences d'ADN mitochondrial seront utilisées. L'ADN mitochondrial possède plusieurs propriétés qui en font un marqueur génétique très intéressant. Il s'agit d'une petite molécule circulaire retrouvée dans les mitochondries en plusieurs centaines de copies identiques (Avisé *et al.* 1987) ce qui facilite l'amplification par réaction de polymérase en chaîne (PCR). L'ADN mitochondrial est transmis de façon uniparentale, soit maternellement chez la plupart des organismes (dont les mammifères et les insectes), et ne subit pas de recombinaison, ce qui permet de retracer facilement l'histoire des lignées évolutives (Avisé *et al.* 1987).

L'ADN mitochondrial est extrêmement variable chez les vertébrés du fait de son taux d'évolution très rapide, de plus de trois fois plus élevé que l'ADN nucléaire en copie unique (Mitton 1994). Toutefois, ceci n'est pas nécessairement toujours vrai chez les insectes où le taux de substitution de l'ADN mitochondrial est comparable à celui des gènes nucléaires en copie simple (Crozier *et al.* 1989). L'ADN nucléaire des insectes évoluant huit fois plus vite que celui des primates (Zhang & Hewitt 1997), sa variabilité, ainsi que celle de l'ADN mitochondrial, est sensiblement la même que celle de l'ADN mitochondrial des vertébrés (Moritz *et al.* 1987). Sa grande variabilité et son mode de transmission maternel font donc de l'ADN mitochondrial un outil de choix qui a été abondamment utilisé pour les études de génétique des populations ou de phylogéographie, autant chez les insectes que chez les rongeurs (ex. Azeredo-Espin *et al.* 1991, Vogler *et al.* 1993, Conroy & Cook 2000, Geurgas *et al.* 2000, Sullivan *et al.* 2000)

1.7.2 Gènes mitochondriaux sélectionnés

Puisque les relations induites à partir des séquences mitochondriales des cutébrés et des souris seront comparées, il importe de choisir des marqueurs moléculaires ayant sensiblement le même taux d'évolution chez les deux espèces (Jarne & Theron 2001). Pour les *Peromyscus*, le gène mitochondrial de la cytochrome oxidase III (COIII) d'une longueur de 750 pb sera utilisé. Cette portion de l'ADN mitochondrial a démontré un niveau de variabilité approprié pour des études de phylogéographie chez des espèces de *Peromyscus* (Riddle *et al.* 2000a et 2000b), des souris à abajoues (*Perognathus sp.*) et des souris-à-sauterelles (*Onychomys sp.*) (Riddle 1995). En ce qui concerne les cutébrés, l'information sur les amorces et les gènes utilisables dans un cadre phylogéographique est très restreinte puisque les deux seules études moléculaires incluant des représentants des Cuterebrinae se situaient à un niveau taxonomique élevé (Otranto *et al.* 2003).

Plusieurs amorces universelles ou développées pour la drosophile (*Drosophila sp.*) ou d'autres espèces de d'insectes furent testées. Le gène COIII fut retenu pour des raisons de concordance avec les souris. Toutefois, la variabilité de ce gène s'étant avérée insuffisante, d'autres régions mitochondriales furent explorées. Contrairement à la plupart des vertébrés,

la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (D-loop), n'est pas nécessairement la région qui montre la plus grande variabilité. Chez les insectes, cette région porte le nom de région riche en A-T du fait de sa composition élevée en adénine et en thymine. Par exemple, on retrouve 91% de A-T chez le Cuterebrinae *Dermatobia hominis* (Lessinger & Azeredo-Espin 2000), une proportion tout à fait normale qui se situe habituellement autour de 85% pour les insectes (Zhang & Hewitt 1997). Cette haute proportion de A-T montre qu'il y a probablement une pression de sélection en faveur des A-T, réduisant ainsi les possibilités de variation et augmentant les probabilités de substitutions multiples. La région de contrôle n'est donc pas une région de choix pour les études de phylogéographie chez les insectes.

Finalement, les gènes de la cytochrome oxidase II et III furent également sélectionnés en raison de leur facilité d'amplification et de leur variabilité qui s'est avérée suffisante lors d'études préliminaires.

1.8 ORGANISATION DU MÉMOIRE

Les deux chapitres qui suivent présentent, sous forme d'articles scientifiques, les résultats obtenus lors de ces travaux. Le premier propose deux techniques moléculaires permettant de distinguer *C. grisea* de *C. fontinella*, alors que le second traite de la coévolution entre les cutérèbres et les souris du genre *Peromyscus*. Le dernier chapitre, quant à lui, fait une synthèse des résultats obtenus et constitue une discussion et conclusion globale intégrant une critique ainsi que des avenues futures de recherches.

CHAPITRE 2

MOLECULAR IDENTIFICATION OF TWO CRYPTIC SPECIES OF MYIASIS-CAUSING *CUTEREBRA* BY MULTIPLEX-PCR AND RFLP

Cet article a été accepté dans Medical and Veterinary Entomology :

Noël S, Tessier N, Angers B & Lapointe F-J (2003) Molecular identification of two cryptic species of myiasis-causing *Cuterebra* by multiplex-PCR and RFLP. Soumis.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant

Nom de l'étudiant : Sarah Noël-Boissonneault
 Sigle et titre du programme : M. Sc. Sciences biologiques

2. Description de l'article

Cet article a été accepté dans la revue Medical and Veterinary Entomology :

Noël S, Tessier N, Angers B, Wood DM & Lapointe F-J (2003) Molecular identification of two cryptic species of myiasis-causing *Cuterebra* by multiplex-PCR and RFLP.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Sarah Noël-Boissonneault inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Coévolution des populations québécoises de cutérèbres (*Cuterebra grisea* et *Cuterebra fontinella*) et de souris du genre *Peromyscus* : la souris sylvestre (*P. maniculatus*) et la souris à pattes blanches (*P. leucopus*)».

F. J. Lapointe
 Coauteur

19/01/04
 Date

Bernard Angers
 Coauteur

15/01/04
 Date

D. M. Wood
 Coauteur

14 janvier/04
 Date

NATHALIE TESSIER
 Coauteur

19/11/03
 Date

2.1 RÉSUMÉ

Les larves des diptères *Cuterebra grisea* (Coquillet) et *Cuterebra fontinella* (Clark) sont des endoparasites des rongeurs et lagomorphes. La grande ressemblance morphologique de ces deux espèces rend l'identification des adultes très difficile. De plus, l'existence de spécimens adultes de forme intermédiaire en nature et de colonies d'une espèce de cutérèbres produisant des formes typiques de l'autre espèce, et vice versa, viennent complexifier la situation. Aussi, il est actuellement impossible d'identifier les larves de ces espèces. Cet article propose deux approches moléculaires qui permettent de distinguer *C. grisea* et *C. fontinella* par des patrons de bandes spécifiques sur gel d'agarose. Ces patrons sont produits, dans le premier cas, par l'amplification spécifique différentielle d'ADN par PCR. Dans le deuxième cas, c'est l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) qui fut utilisé pour générer des patrons de bandes. Les deux techniques ont été testées sur des larves et des spécimens adultes de musée et ont produit des patrons de bandes propres à chaque espèce. Toutefois, le taux d'identification était plus élevé avec l'amplification spécifique différentielle qu'avec les RFLP pour l'ADN dégradé en raison de la taille plus courte des fragments générés par amplification spécifique différentielle. Les résultats obtenus présentent des différences entre les identifications morphologiques des spécimens adultes et l'identification moléculaire, ce qui suggère que certains de ces spécimens n'ont pas été correctement identifiés. En particulier, tous les spécimens provenant de la Colombie-Britannique, là où se trouve la localité-type de *C. grisea*, ont été identifiés *C. fontinella*, ce qui remet en cause les noms associés aux populations de *Cuterebra* de l'est et de l'ouest du pays.

2.2 ABSTRACT

The myiasis-causing flies *Cuterebra grisea* (Coquillett) and *Cuterebra fontinella* (Clark) (Diptera: Oestridae) are normally parasites of mice, predominantly of the genus *Peromyscus*. The morphological similarities of these species and the existence of intermediate morphotypes bearing characters of both species make the identification of adults problematic; furthermore the identification of larvae is apparently not possible. This paper presents two molecular approaches to discriminate between these species using specific band patterns: (1) species-specific primers designed in the COII region used in multiplex-PCR and (2) restriction fragment length polymorphism (RFLP) on amplified segments of COI gene. Both methods were tested on *Cuterebra* larvae and on adult museum specimens. The two techniques showed a clear difference between *C. grisea* and *C. fontinella*, although species-specific primers were more successful than RFLP for degraded DNA. No intraspecific variation in RFLP and species-specific amplifications was detected for the two species of *Cuterebra*. Our results exhibited discrepancies between molecular and morphological identification, suggesting that some of the adults were misidentified.

2.3 INTRODUCTION

Flies of the genus *Cuterebra* are distributed throughout most of the temperate and tropical parts of the New World (Sabrosky 1986, Wood 1987). Their larvae infest the skin of living rodents, lagomorphs and monkeys, and perhaps other mammals as well, causing in turn myiasis. The first instar larvae enter the body of their host through moist natural openings (nostrils, eyes, mouth, anus, urogenital orifices) or skin lacerations and complete their development in a warble, or skin boil, after passing through a period of migration within the tissues (Hunter & Webster 1973b). They breathe via their posterior spiracles located in a small opening in the skin of the host. At maturity, the parasite exits the host via this breathing hole, falls to the ground and pupates (Catts 1982). Although *Cuterebra* usually target wild animals, they can occasionally infest aberrant hosts such as pets (Crawley 1923, Harris *et al.* 2000) and even humans (Keth 1999, Safdar *et al.* 2003).

Cuterebra fontinella (Clark) and *Cuterebra grisea* (Coquillett) have been regarded as either full sister-species (Hunter & Webster 1973a) or as subspecies (Sabrosky 1986) with partially overlapping geographical distributions in North America. *Cuterebra fontinella* was described from Illinois, and ranges from southern Canada to Mexico, while *C. grisea*, described from British Columbia, ranges across all Canada and Northern USA (Sabrosky 1986). Only one other species of *Cuterebra* is distributed in eastern Canada : *C. emasculator*. Larvae of *C. fontinella* usually parasitize White-footed Mice (*Peromyscus leucopus*) while those of *C. grisea* parasitize Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*) (Sabrosky 1986). When found in sympatry, it is quite difficult to tell these two flies apart, their only known differences being the color of the hair on the scutum (i.e. yellow for *C. grisea* and black for *C. fontinella*), and the presence of a black spot on the anepisternum (mesopleuron) in *C. fontinella* (Sabrosky 1986). Moreover, intermediate forms bearing characters of both species (e.g. yellow-haired scutum with a black anepisternal spot or black-haired scutum without the black anepisternal spot) have also been found in the wild (Hunter 1973; Hunter & Webster 1973). Identification of these species on the basis of morphological characters is thus very complex, such that molecular markers are needed to

clarify the situation. Furthermore, although it is possible to identify the eggs of some *Cuterebra* species using scanning electron microscopy (Colwell *et al.* 1999), it is not yet possible to distinguish larvae of *C. fontinella* and *C. grisea* on the basis of morphological characters alone. Thus, the aim of this work is to develop molecular markers for the identification of *C. grisea* and *C. fontinella* that would solve the problem of identification of larvae and adults.

Two molecular approaches relying on divergent sites between species were assessed for their identification. Mitochondrial DNA was chosen because of its large number of copies and its high mutation rate causing sequence differences between closely related species or subspecies. Cytochrome oxidase I (COI) and cytochrome oxidase II (COII) genes proved to be useful for the discrimination of some species of Oestridae (Otranto *et al.* 2000, Otranto *et al.* 2003a,b) and Calliphoridae (Sperling *et al.* 1994, Malgorn & Coquoz 1999, Wells & Sperling 2001), so these genes were selected. The first approach uses species-specific primers designed to amplify COII segments of different sizes in the two species. The other relies on specific band patterns produced by restriction fragment length polymorphism (RFLP) on PCR amplified segments of COI. The following procedure was employed to design specific markers: (1) collection of molecular data by sequencing specimens of both species to identify divergent sites, (2) design of species-specific primers, (3) identification of restriction sites on divergent sites, and (4) evaluation of the molecular tools using specimens of known and unknown identity.

2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Samples and DNA isolation

A total of 47 larvae were collected from deer and white-footed mice caught from 1995 to 2000, and were *a priori* identified according to their host as *C. grisea* ($n = 35$) and *C. fontinella* ($n = 12$) respectively (Fig.1, Table 1). Tissue samples were also collected from 25 adult museum specimens, including some individuals dating back as far as 1922 (Fig.1, Table 2). For purposes of identification of these adult specimens, we have applied the

name *C. fontinella* to reared adults obtained from white-footed mice in Ontario and southern Québec, and also to wild-caught adults which have dark scutal hair, and a pronounced black spot on the anepisternum, as being consistent with the characters used by Sabrosky (1986) to separate this species from *C. grisea*. We have used the name *C. grisea* for all the others, many of which were identified as *C. grisea* by both Sabrosky, and Hunter. Host association with deer mice, as well as possession of a typical *C. grisea* color pattern (pale scutal hair without a pronounced dark spot on the anepisternum), characterized most of these specimens, but a few, especially those from British Columbia that were collected by Hunter, are intermediate, although they were labelled *C. grisea* by Hunter and Sabrosky.

DNA was extracted from larvae using a standard phenol-chloroform protocol (Sambrook *et al.* 1989), and from a single hind leg of adult flies using DNAzol (Chomczynski *et al.* 1997). To do so, the leg was first ground with a disposable pestle, and then treated using the protocol described in Junqueira *et al.* (2002). Total DNA was quantitated by reading the optical density with a spectrophotometer.

2.4.2 Sequencing

In order to assess divergent sites, portions of two mitochondrial genes were amplified and sequenced. A COI segment of 476 bp was amplified using primers C1-J-2183 (forward) and C1-N-2659 (reverse) and a 523 bp fragment was amplified using primers C2-J-3138 (forward) and C2-N-3661 (reverse) (Simon *et al.* 1994). Amplification reactions were carried out in 25 µl volumes including 2.5 µl of 10X reaction buffer, 2.5mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.3 µM of each primer, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase and 60 ng of template DNA. PCR conditions were as follows: after an initial denaturation at 94°C for 2 min, cycling was performed for 35 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 42°C and 1 min at 72°C with a final extension of 5 min at 72°C. PCR products were purified using Qiaquick purification kit (Qiagen), and directly sequenced in both directions with a CEQ 2000 sequencer (Beckman Coulter Inc).

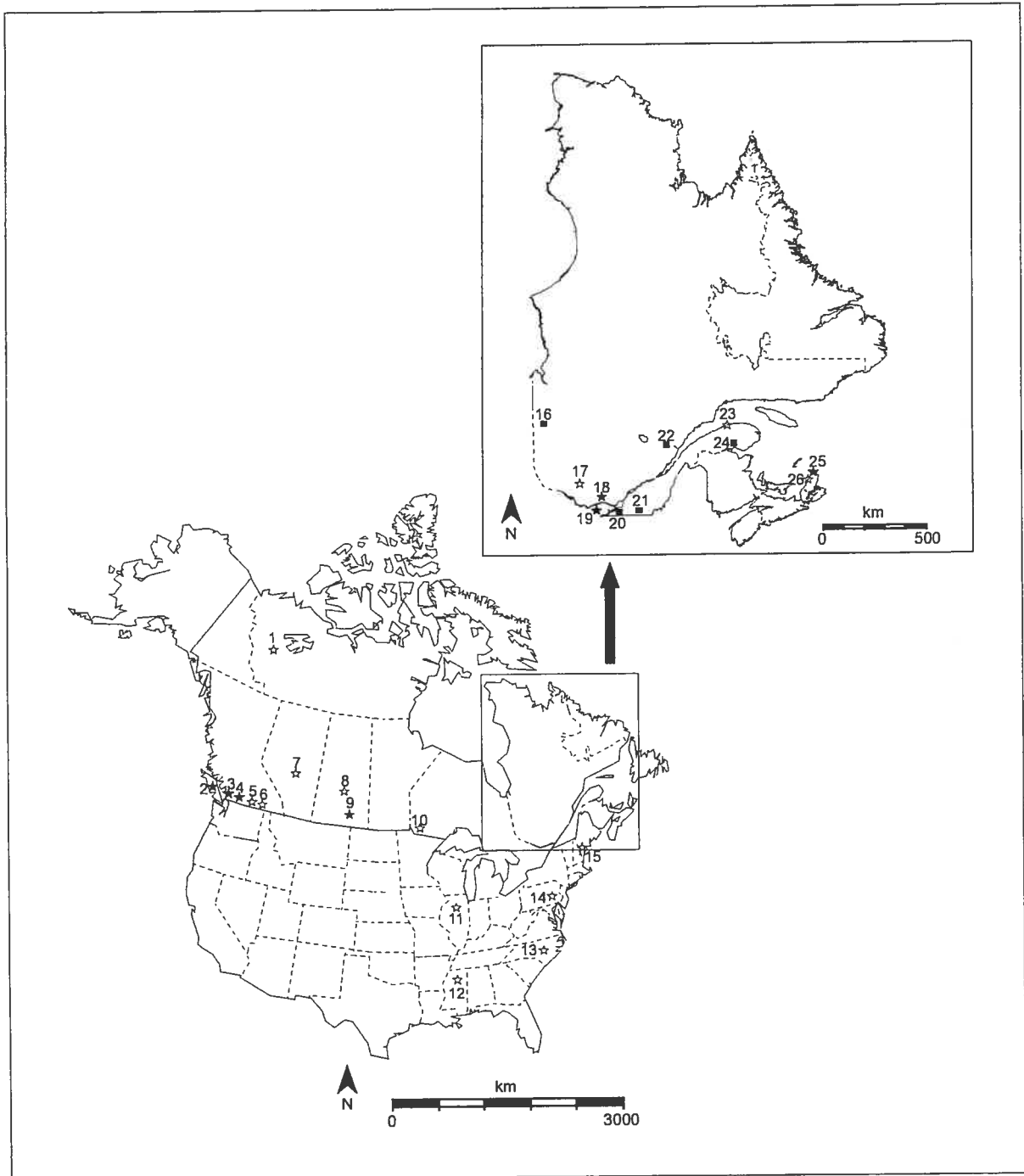


Figure 2.1 Collection locality of the *Cuterebra* larvae (n) and adult museum specimens (★, ☆) used in the present study. ☆ represent museum specimens that could not be identified with the molecular markers. The location numbers refer to Tables 1 and 2.

COI sequences were obtained for 19 *C. grisea* and 11 *C. fontinella* specimens (Genbank accession numbers AY507166 – AY507195) whereas COII sequences were obtained for 13 *C. grisea* and 11 *C. fontinella* specimens (AY507199 – AY507222). The sequences were aligned using Clustal X (Thompson et al. 1997) and edited manually. Visual inspection of the aligned sequences allowed the identification of seven and three divergent sites in COI and COII respectively, permitting the discrimination of *C. grisea* from *C. fontinella*. All identifications made *a priori* on the basis of host species were further confirmed by sequencing.

2.4.3 Species-specific primers design

Two primers were designed in the COII region according to general rules proposed by Innis & Gelfand (1990) while minimizing the length of the amplified segment to facilitate the amplification of potentially degraded DNA. As the sequence variability was low, the primer design involved one specific reverse primer and one generic reverse primer to be use in multiplex with the forward primer C2-J-3138. The specific primer C.fonti-N (5'- TGT TTG CCC ATG TAA TAG -3') amplifies a 170 bp segment in conjunction with C2-J-3138 whereas the generic primer C.univ-N (5'- TGG GAA GGC AAT AAA TAG – 3') amplifies a 210 bp segment in conjunction with C2-J-3138. Thus, the use of C.univ, C.fonti and C2-J-3138 in a multiplex reaction should produce the generic band of 210 bp and the specific band of 170 bp for *C. fontinella*, whereas only the generic band of 210 bp should be obtained for *C. grisea*. This generic band is meant as a positive test to confirm that the absence of the 170 bp segment is not due to PCR failure.

The species-specific primers and C2-J-3138 were used in a multiplex-PCR. The PCR master mix was the same as above and PCR conditions of the multiplex-PCR reaction were an initial denaturation of 3 min at 94°C followed by 40 cycles of 10 s at 94°C, 10 s at 51°C, 30 s at 70°C with a final extension of 2 min at 70°C. PCR products were then run on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The band patterns visualized under UV light were used to identify the specimens.

2.4.4 RFLP

Visual examination of the aligned sequences allowed the detection of one endonuclease restriction site for *HapII* at a divergent site. The site being present only for *C. grisea*, the digestion of the COI segment, amplified using C1-J-2183 and C1-N-2659, by *HapII* should give two fragments of approximately 160 bp and 315 bp for *C. grisea*, and a single uncut segment of 476 bp for *C. fontinella*. The digestion of the amplified COI fragment was carried out at 37°C overnight, in 15 µl volumes including 12.5 µl of PCR products, 2 U of *HapII* and 1.5 µl of enzyme-specific buffer. RFLP products were then run on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The band patterns visualized under UV light were used to identify the specimens.

2.4.5 Evaluation of the molecular identification tools

First, in order to assess the reproducibility of the species-specific primers and the RFLP markers, 31 larvae (19 *C. grisea* and 12 *C. fontinella*) previously identified by sequencing of COI or COII segments were analyzed. Second, to evaluate the efficiency of the markers, specimens with potentially degraded DNA (16 unidentified larvae that could not be sequenced because of PCR failure and 25 museum specimens) were also analyzed.

2. 5 RESULTS

2.5.1 Species-specific primers

The band patterns obtained with species-specific primers were as expected for all specimens of known identity. The *C. fontinella* specific band of 170 bp and the generic band of 210 bp were obtained for all amplifications of *C. fontinella* larvae. On the other hand, only the 210 bp band was observed for all amplifications of *C. grisea* (Fig. 2). All larvae previously identified by sequencing were successfully amplified and all the identifications from species-specific primers were concordant with those from sequencing (Table 1). The method also allowed for the identification of 11 of the 25 adult museum specimens (44%) and 11 of the 16 unidentified larvae (69%) (Table 2).

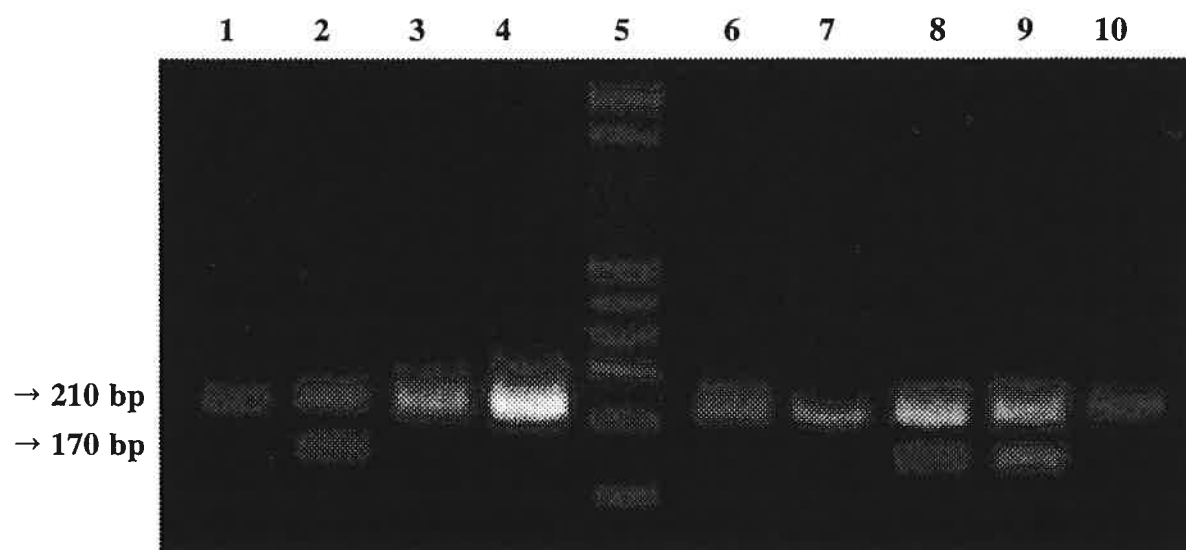


Figure 2.2 Results of PCR amplification using species-specific primers showing the *C. fontinella* band (170 bp) and the generic band (210 bp). Lanes 1, 3, 4, 6, 7, 10: *C. grisea*. Lanes 2, 8, 9: *C. fontinella*. Lane 5: 100 bp ladder size standard.

Table 2-I Collection locality (with superscript numbers referring to Fig. 1) of *Cuterebra* larvae used to design specific markers and results of identification (ID) with sequencing, species-specific primers (Primers ID) and RFLP.

Location	Nb. of individuals	Sequence ID	Primers ID	RFLP ID
Haut St-Laurent (QC) ²⁰	12	<i>C. fontinella</i>	<i>C. fontinella</i>	<i>C. fontinella</i>
Lac Duparquet (QC) ¹⁶	16	<i>C. grisea</i>	<i>C. grisea</i>	<i>C. grisea</i>
Rivière Cascapedia (QC) ²⁴	1	<i>C. grisea</i>	<i>C. grisea</i>	<i>C. grisea</i>
Rivière Château (QC) ²¹	1	<i>C. grisea</i>	<i>C. grisea</i>	<i>C. grisea</i>
Saguenay (QC) ²²	1	<i>C. grisea</i>	<i>C. grisea</i>	<i>C. grisea</i>

Table 2-II Collection locality (with superscript numbers referring to Fig. 1) and collection date of adult museum specimens for which identification was obtained for molecular markers, and results of identification (ID) with morphological characters, sequencing, species-specific primers and RFLP.

Voucher	Location	Date	Morphological ID	Sequence ID	Primers ID	RFLP ID
S.B. 025	Indian head (SK) ⁹	1937	<i>C. grisea</i>	-	<i>C. fontinella</i>	-
S.B. 006	Port Coquitlam (BC) ⁴	1971	<i>C. grisea</i>	-	<i>C. fontinella</i>	-
S.B. 027	Port Coquitlam (BC) ⁴	1971	<i>C. grisea</i>	-	<i>C. fontinella</i>	-
S.B. 026	Burnaby (BC) ³	1972	<i>C. grisea</i>	-	<i>C. fontinella</i>	-
S.B. 028	Burnaby (BC) ³	1972	<i>C. grisea</i>	-	<i>C. fontinella</i>	-
S.B. 013	Ottawa (ON) ¹⁹	1973	<i>C. fontinella</i>	-	<i>C. fontinella</i>	<i>C. fontinella</i>
S.B. 014	Pleasant Bay (NS) ²⁵	1984	<i>C. grisea</i>	-	<i>C. grisea</i>	-
S.B. 024	Vancouver Island (BC) ²	1984	<i>C. grisea</i>	-	<i>C. fontinella</i>	-
S.B. 020	Aylmer (QC) ¹⁸	1986	<i>C. fontinella</i>	-	<i>C. fontinella</i>	-
S.B. 017	Ottawa (ON) ¹⁹	1990	<i>C. fontinella</i>	-	<i>C. fontinella</i>	<i>C. fontinella</i>
S.B. 012	Ottawa (ON) ¹⁹	1996	<i>C. fontinella</i>	<i>C. fontinella</i>	<i>C. fontinella</i>	<i>C. fontinella</i>

Specimens with vouchers numbers S.B.001, S.B.003-005, S.B.007-008, S.B.010-011, S.B.015-016, S.B.018-019, S.B.022-023 could not be identified with molecular markers.

2.5.2 RFLP

Digestion of the COI segment with *HapII* resulted in two fragments for all amplifications of *C. grisea* larvae, whereas the COI fragment remained intact for all amplifications of *C. fontinella* larvae (Fig. 3). All larvae previously identified by sequencing were correctly identified by RFLP (Table 1). On the other hand, the COI amplification success for potentially degraded DNA was lower than with species-specific primers, as only three of the museum specimens (12%) and six of the unidentified larvae (38%) could be identified with RFLP (Table 2).

2.6 DISCUSSION

Both molecular markers developed in this study to discriminate *C. grisea* from *C. fontinella* exhibited unambiguous specificity. Indeed, all identifications of larvae with species-specific primers or with RFLP were concordant with identifications made by sequencing of COI and/or COII. The design of species-specific primers represents a quick, inexpensive and easy method to discriminate among closely related species, and is thus becoming increasingly popular for the identification of cryptic species (e.g. Amicucci *et al.* 1998, Michaux *et al.* 2001, Lin *et al.* 2002, Song *et al.* 2003). Restriction fragment length polymorphism has also been widely used (e.g. Otranto *et al.* 2000, Otranto *et al.* 2003) and has proven to be useful to differentiate *C. grisea* from *C. fontinella*. However, the identification success rates obtained with RFLP were much lower than those obtained with species-specific primers, especially for degraded DNA. The RFLP markers developed in this work require the amplification of a 476 bp fragment, whereas the species-specific primers amplify shorter fragments (170-210 bp). Because short fragments are more likely to be amplified in sheared DNA (Dean & Ballard 2001), the performance of the RFLP could therefore be increased by using primers designed to amplify a shorter fragment of the COI gene comprising the restriction site for *Hap II*.

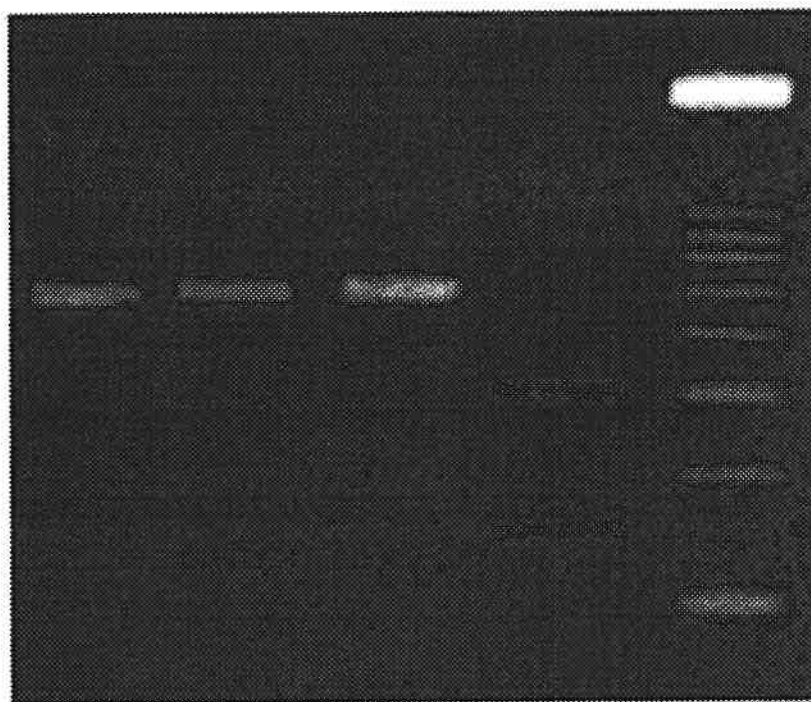


Figure 2.3 Results of the digestion of COI segment with *HapII* showing the intact 476 bp band for *C. fontinella* (lanes 1-3) and the two fragments of 160 bp and 315 bp for *C. grisea* (lane 4). Lane 5: 100 bp ladder size standard.

On the other hand, the molecular identifications of adult specimens from museum collections were not always in agreement with the morphological identifications. In particular, all the specimens from British Columbia (the type locality of *C. grisea*) that were successfully analyzed have turned out to be identical with eastern *C. fontinella*, but different from the eastern specimens that we have also called *C. grisea*. These discrepancies illustrate the difficulty of identifying adults from morphological characters only, especially knowing that *C. fontinella* and *C. grisea* females reared in the lab can produce pure forms of both species as well as intermediate forms (Sabrosky 1986). This observation could mean that *C. grisea* and *C. fontinella* are in fact subspecies, or even that some of the populations of what we have called *C. grisea* are conspecific with *C. fontinella* and that polymorphism is responsible for the color variation. Alternatively, the presence of intermediate forms could also be the consequence of hybridization between the two species of *Cuterebra*, as previously suggested by Sabrosky (1986). Given that hybrids can occur in Calliphoridae (Stevens *et al.* 2002), a related family, this hypothesis should be taken seriously. Unfortunately, the two markers developed in this study are based on mitochondrial DNA which is only inherited maternally (Moritz *et al.* 1987). It remains possible that the molecular identifications based on mitotypes would not be the same as those provided by nuclear markers, which would suggest hybridization between *C. grisea* and *C. fontinella*.

2.7 CONCLUSION

In this paper, we have presented two molecular methods that rely on specific band patterns to discriminate two species of *Cuterebra* that have been previously identified as *C. grisea* and *C. fontinella*. Both methods were shown to be reliable when tested on specimens of known identity and were successful even when used with tiny amounts of DNA extracted from museum specimens more than 60 years old. However, our results have shown that the western and eastern populations of what has been regarded as *C. grisea* are not the same, and that the western populations, from British Columbia (from where *C. grisea* was described) and Saskatchewan, may be conspecific with *C. fontinella*, and different from the

eastern populations from Québec and Nova Scotia. If this result could be substantiated, it could mean that the name *C. grisea* may become a synonym of *C. fontinella*, the older name, and that another name may be required for the eastern populations of *C. grisea*. Further taxonomic studies, including restudy of the type material and acquisition of additional material from the type localities, will be necessary to resolve the problem of which species name to attach to which population.

2.8 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank R. Charest, J. Jutras, G. Lupien and D. St-Hilaire from the Société de la faune et des parcs du Québec (FAPAQ) for providing mice and P.-A. Landry and P. Girard for collecting *Cuterebra* larvae in wild mice. We would also like to thank members of the Laboratoire d'écologie moléculaire et évolution (LEMEE) for technical support in the field and the lab and for helpful comments on an earlier draft of this manuscript. This work was supported by scholarships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) to S. Noël and by NSERC grants to B. Angers and F-J. Lapointe.

CHAPITRE 3

SIMILAR GENETIC STRUCTURE OF TWO MICE SPECIES (*PEROMYSCUS*) AND THEIR *CUTEREBRA* PARASITES AT THE POPULATION LEVEL

Cet article sera prochainement soumis à Molecular Ecology:

Noël S, Angers B & Lapointe F-J (2003) Similar genetic structure of two mice species (*Peromyscus*) and their *Cuterebra* parasites at the population level.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant

Nom de l'étudiant : Sarah Noël-Boissonneault
 Sigle et titre du programme : M. Sc. Sciences biologiques

2. Description de l'article

Cet article sera prochainement soumis :

Noël S, Angers B & Lapointe F-J (2003) Similar genetic structure of two mice species (*Peromyscus*) and their *Cuterebra* parasites at the population level.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Sarah Noël-Boissonneault inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Coévolution des populations québécoises de cutérèbres (*Cuterebra grisea* et *Cuterebra fontinella*) et de souris du genre *Peromyscus* : la souris sylvestre (*P. maniculatus*) et la souris à pattes blanches (*P. leucopus*)».

F.J. Lapointe
 Coauteur

19/01/04
 Date

Bernard Angers
 Coauteur

19/01/04
 Date

3.1 RÉSUMÉ

Les relations entre des populations de souris sylvestres (*Peromyscus maniculatus*) et de souris à pattes blanches (*P. leucopus*) et leurs parasites du genre *Cuterebra* ont été étudiées. La structure des populations de ces espèces a été inférée en utilisant les séquences des gènes mitochondriaux de la cytochrome oxidase I, II et III pour des spécimens provenant de sept populations québécoises. Les analyses génétiques ont révélé que le modèle d'isolement par distance s'applique uniquement à la souris sylvestre et à son parasite (*C. grisea*). De plus, il y a une corrélation significative entre les distances génétiques de *P. maniculatus* et *C. grisea*, mais pas pour l'autre paire hôte-parasite. L'absence de résultats positifs pour *P. leucopus* et *C. fontinella* pourrait être dû à la faible échelle géographique à laquelle ces espèces ont été échantillonnées. Les populations de *P. maniculatus* et *C. grisea* des rives nord et sud du fleuve St-laurent ont également montré un niveau de différenciation significatif. Le fleuve représente une barrière à la dispersion pour *P. maniculatus*, ce qui explique la différenciation nord/sud observée. Toutefois, puisque *C. grisea* a un vol puissant, cette espèce peut assurément traverser le St-Laurent. Nous suggérons donc que la coévolution est une force importante qui maintient la différenciation nord/sud des *Cuterebra* en l'absence de barrières géographiques.

3.2 ABSTRACT

The relationships between populations of the Deer Mouse (*Peromyscus maniculatus*) and the White-footed Mouse (*P. leucopus*) and their respective *Cuterebra* parasites were examined. Population genetic structure was inferred using cytochrome oxidase mitochondrial sequences of specimens coming from seven populations. Genetic analyses revealed that isolation-by-distance applies for the Deer Mouse and its associated parasite (*C. grisea*) and a significant correlation was observed between genetic distances of these host and parasite species. Populations of *P. maniculatus* and *C. grisea* from the North and South shores of the St. Lawrence River were also found to be significantly different. Since the River is a dispersal barrier for *P. maniculatus*, but not for *C. grisea*, we suggest that coevolution may have shaped the population structure of *C. grisea*.

3.3 INTRODUCTION

Host populations represent the vital resource for parasites, and the genetic structure of parasites should thus reflect the close association with their corresponding host (Mulvey *et al.* 1991, Jerome & Ford 2002). Accordingly, a similarity is expected between the genetic structure of associated hosts and parasites when dispersal and population extinction occur jointly (Parker & Spoerke 1998). Also, the role of gene flow is of primary importance in their evolutionary process (Gandon *et al.* 1996). For example, low gene flow between parasite populations promote local adaptation and may lead to host-race formation (Price 1980), which is the formation of specialized populations of parasites that use different hosts species. Conversely, high gene flow between host or parasite populations will prevent local adaptation and population differentiation of both organisms (Gandon *et al.* 1996).

It is crucial to know the genetic structure of hosts and parasites to understand the evolution of interactions among populations (Dybdahl & Lively 1996). However, few studies have investigated host-parasite relationships at the intraspecific level (Nadler *et al.* 1990, Mulvey *et al.* 1991, Michalakis *et al.* 1993, Dybdahl & Lively 1996, Althoff & Thompson 1999, Davies *et al.* 1999, Delmotte *et al.* 1999, Martinez *et al.* 1999, Jobet *et al.* 2000, Jerome & Ford 2002). Moreover, evidence of congruent population structure was only observed in chewing lice (*Geomydoecus actuosus*) and pocket gophers (*Thomomys bottae*) (Nadler *et al.* 1990), and in parasitic angiosperms (*Arceuthobium americanum*) and their hosts of the genus *Pinus* (Jerome & Ford 2002). In this paper, we explore the population structure of two species of mice of the genus *Peromyscus* (Rodentia: Muridae) and their respective parasites of the genus *Cuterebra* (Diptera: Oestridae).

Flies of the genus *Cuterebra* are distributed throughout most of the temperate and tropical parts of the New World (Wood 1987, Sabrosky 1986). Their larvae infest the skin of living rodents, lagomorphs and monkeys, and perhaps other mammals as well, causing in turn myiasis. The female *Cuterebra* lays its eggs on the vegetation or the soil. When a potential host passes nearby, the heat of its body stimulates the hatching of the eggs. The

small larva then enters the body of its host through any moist natural openings (*i.e.* nostrils, eyes, mouth, anus, and urogenital orifices) or skin lacerations. After a short internal migration, the parasite reaches its final development site under the skin, where it will complete its growth in a warble, breathing via a small opening in the skin and feeding on the host's dead or living tissue, liquid body-substance, or ingested food (Zumpt 1965). Three weeks later, the larva reaches full maturity, exits the host through the breathing hole and crawls into the soil where it will pupate over winter. The adults then emerge in the following spring (Catts 1982).

Cuterebra fontinella and *C. grisea* are sister-species (Hunter & Webster 1973a) with partially overlapping geographical distributions. Whereas *C. fontinella* is distributed from Southern Canada to Mexico, the range of *C. grisea* covers all of Canada and Northern USA (Sabrosky 1986). When found in sympatry, it is quite difficult to tell them apart using morphological characters alone (Sabrosky 1986). Moreover, intermediate forms bearing characters of both species have also been observed in the wild (Hunter 1973, Hunter & Webster 1973b).

Cuterebra fontinella and *C. grisea* are believed to parasitize the White-footed Mouse (*Peromyscus leucopus*) and the Deer Mouse (*P. maniculatus*), respectively (Sabrosky 1986). However, this assumed host-specificity is poorly documented, partly because of the extreme difficulty of identification of *Cuterebra* larvae. Recently, Noël *et al.* have developed a molecular tool that allows clear identification of these species (*in press*). The mice species *P. leucopus* and *P. maniculatus* live in sympatry in Eastern Canada and are also very difficult to discriminate with morphological characters, such that electrophoresis of salivary enzymes (Aquadro & Patton 1980) or DNA analyses (Tessier *et al.* submitted) are often required to tell them apart.

To examine the parasitic relationship among cryptic species of *Peromyscus* and *Cuterebra* in Eastern Canada, we have addressed the following questions in a phylogeographic framework: (1) What is the host specificity of the two species of parasites? (2) Is there

population differentiation? (3) Is there isolation-by-distance? (4) Are geographical barriers representing an important factor to shape the population structure of *Peromyscus* and *Cuterebra*? (5) Is there congruence between population structure of *Peromyscus* and their *Cuterebra* parasites?

3.4 MATERIALS AND METHODS

3.4.1 Samples

Samples were collected throughout Québec (Canada) in areas covering the distribution ranges of Deer Mice and White-footed Mice. All mice were captured using Havahart live traps or snap traps baited with peanut butter. The specimens were then preserved in 95% ethanol or frozen until further use. Immature *Cuterebra* larvae were recovered from underneath the skin of preserved mice, whereas a few mature larvae were collected in the field when they exited dead mice.

Other rodents accidentally trapped such as the Woodland Jumping Mouse (*Napaeozapus insignis*) and the Southern Red-backed Vole (*Clethrionomys gapperi*) were also found to harbor *Cuterebra*. These parasites were thus included in the study to determine host specificity, as was a specimen of *Cuterebra* extracted from a domestic Eastern Chipmunk (*Tamias striatus*).

Dermatobia hominis is the only species found in the sister genus of *Cuterebra*. Since no sequences were available for other species of *Cuterebra*, it was thus included as the closest possible outgroup to root the parasite tree. For hosts, the outgroup selected was the Southern Red-backed Vole, a related species from the Muridae family.

3.4.2 Molecular analysis

DNA was extracted from mice liver and *Cuterebra* larvae using a standard phenol-chloroform protocol (Sambrook *et al.* 1989). Species identification of *Cuterebra* and *Peromyscus* was performed using species-specific primers in multiplex PCR (Noël *et al.* in press, Tessier *et al.* submitted).

A portion of the cytochrome oxidase III (COIII) mitochondrial gene that has been used in previous *Peromyscus* studies (Riddle 1995, Riddle *et al.* 2000a, Riddle *et al.* 2000b) was selected to study the phylogeography of hosts. A 705 bp fragment was amplified using primers L8618 and H9323 (Riddle 1995). Amplifications were carried out in 25 µl volumes including 4 µl of 10X reaction buffer, 0.2 mM of each dNTP, 0.15 µM of each primer, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase and 50 ng to 300 ng of template DNA. PCR conditions were as followed: after initial denaturation at 94°C for 2 min, cycling was performed for 34 cycles of 1 min at 94°C, 1 min 45 sec at 54°C and 2 min 30 sec at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C.

For valuable comparisons, the markers used for parasites should have about the same mutation rate and processes than those selected for hosts (Jarne & Theron 2001). Consequently, the COIII gene was also selected to study the phylogeography of *Cuterebra*. To do so, the primers C3-J-5014 and C3-N-5460 were used to amplify a 446 bp fragment (Simon *et al.* 1994). Two other mitochondrial genes were also used; 476 bp of cytochrome oxidase I (COI) was amplified using primers C1-J-2183 in conjunction with C1-N-2659, and 523 bp of cytochrome oxidase II (COII) was amplified using primers C2-J-3138 and C2-N-3661 (Simon *et al.* 1994). Amplification reactions were carried out in 25 µl volumes with the same reaction mix as for *Peromyscus*. PCR conditions for COI were an initial denaturation of 2 min at 94°C followed by 35 cycles of 45 sec at 94°C, 45 sec at 42°C, 1 min at 72°C, with a final elongation of 5 min at 72°C. PCR conditions for COII were the same as COI, with an annealing temperature of 40°C. For COIII, cycling conditions were the same as for *Peromyscus*, with an annealing temperature of 42°C, and 32 cycles.

Amplification success was checked by running PCR products on 2% agarose gel stained with ethidium bromide and by revealing bands under UV light. The PCR products were then purified using Qiaquick purification kit (Qiagen), and directly sequenced in both directions with a CEQ 2000 sequencer (Beckman Coulter) using the same primers as for amplifications.

3.4.3 Data analysis

Sequences were aligned using Clustal X (Thompson *et al.* 1997) and manually edited. The number of variable sites, informative sites, and base composition for each gene were calculated using PAUP* (Swofford 2002), whereas the extent of genetic variation within each species was estimated with θ_s , θ_π and their standard deviation (SD) using Arlequin (Schneider *et al.* 2000).

Neighbor-joining trees based on Jukes-Cantor corrected distances (Jukes & Cantor 1969) were estimated for each gene separately using PAUP*. A test of congruence among distance matrices (CADM) (Legendre & Lapointe, 2004) was then computed to assess whether the different genes could be combined in a total-evidence analysis. Bootstrap support values were calculated for all trees using 1000 replicates.

Population differentiation was assessed by relating genetic distances to a binary matrix containing null distances (0) between individuals from the same population and unit distances (1) between individuals from different populations. The isolation-by-distance model was then tested by correlating genetic distances with geographical distances. To evaluate the effect of an important geographical barrier, namely the St. Lawrence River, genetic distances of hosts and parasites were related to a second binary matrix containing null distances between individuals coming from the same shore of the River, and unit distances between individuals from opposite shores. All distance comparisons were computed with Mantel tests (Mantel 1967), using the R package (Casgrain & Legendre 2001), with 999 permutations.

Congruence between host and parasite populations was tested by measuring the similarity between the corresponding distance matrices or phylogenetic trees to assess whether their topologies are more similar than would be expected by chance alone. To begin with, corrected genetic distances (Jukes & Cantor 1969) for hosts and parasites were directly compared using a Mantel test. Partial Mantel test (Smouse *et al.* 1986) were then performed to account for the effect of geographical distances when comparing matrices of genetic distances. Finally, the path-length distance matrices associated with the neighbor-joining trees were compared using a triple permutation test (Lapointe and Legendre 1992) and their critical values were determined using Permute! (Casgrain 2003).

3.5 RESULTS

3.5.1 Prevalence and host specificity

Only 55 *Cuterebra* were found from over 1300 mice collected (Table 3-I). The highest prevalence was found in two regions : Deux-Montagnes and Abitibi. Within some regions, up to 57% of the individuals could be parasitised in some sites, whereas in other sampling sites, *Cuterebra* seems to be absent. *Cuterebra* larvae were found in a total of seven regions, which will hereafter be called populations, separated by 35 to 735 km (Figure 3.1).

Peromyscus and *Cuterebra* species were genetically identified with species-specific primers. Of the 33 *C. grisea* larvae sampled in *Peromyscus*, 32 (97%) were associated with their “normal” host, the Deer Mouse, and only one (3%) was sampled from the White-footed Mouse. In the case of *C. fontinella*, 13 of 16 larvae (81%) were associated with their typical host, the White-footed Mouse, and three (19%) were associated with Deer Mice (Table 3-I, Figure 3.2). Thus, the parasitic relationship between *Cuterebra* and *Peromyscus* species does not seem to be as specific as originally described (Wood 1981, Catts 1982, Shiffer 1983), at least for the populations under study.

Table 3-I Number of hosts and parasites collected, with prevalence of parasitism in each region. Numbers in parentheses indicate the number of *Cuterebra* specimens for which sequences could be obtained. *Peromyscus sp.* indicates specimens for which identification with species-specific primers have not been done because these were not parasitized

Region	Host	n	<i>C. grisea</i>	<i>C. fontinella</i>	Prevalence
Abitibi	<i>P. maniculatus</i>	245	22 (15)	0	8.9%
Chaudière-Appalaches	<i>P. maniculatus</i>	96	0	1 (1)	1.0%
Deux-Montagnes	<i>P. maniculatus</i>	38	4 (1)	0	10.5%
	<i>C. gapperi</i>	1	0	1 (1)	
Estrie	<i>P. maniculatus</i>	162	2 (1)	0	1.2%
Mauricie	<i>P. maniculatus</i>	21	0	1 (1)	4.7%
Montréal	<i>Peromyscus sp.</i>	194	0	0	6.7%
	<i>P. leucopus</i>	30	1 (1)	13 (12)	
	<i>P. maniculatus</i>	1	0	1 (1)	
	<i>T. striatus</i>	1	0	1 (1)	
Saguenay	<i>P. maniculatus</i>	227	4 (1)	0	3.3%
	<i>C. gapperi</i>	18	3 (3)	0	
	<i>N. insignis</i>	1	1 (1)	0	
Other regions in Québec	<i>P. maniculatus</i>	296	0	0	
	<i>P. leucopus</i>	24	0	0	
Total		1368	37 (23)	18 (17)	3.9%

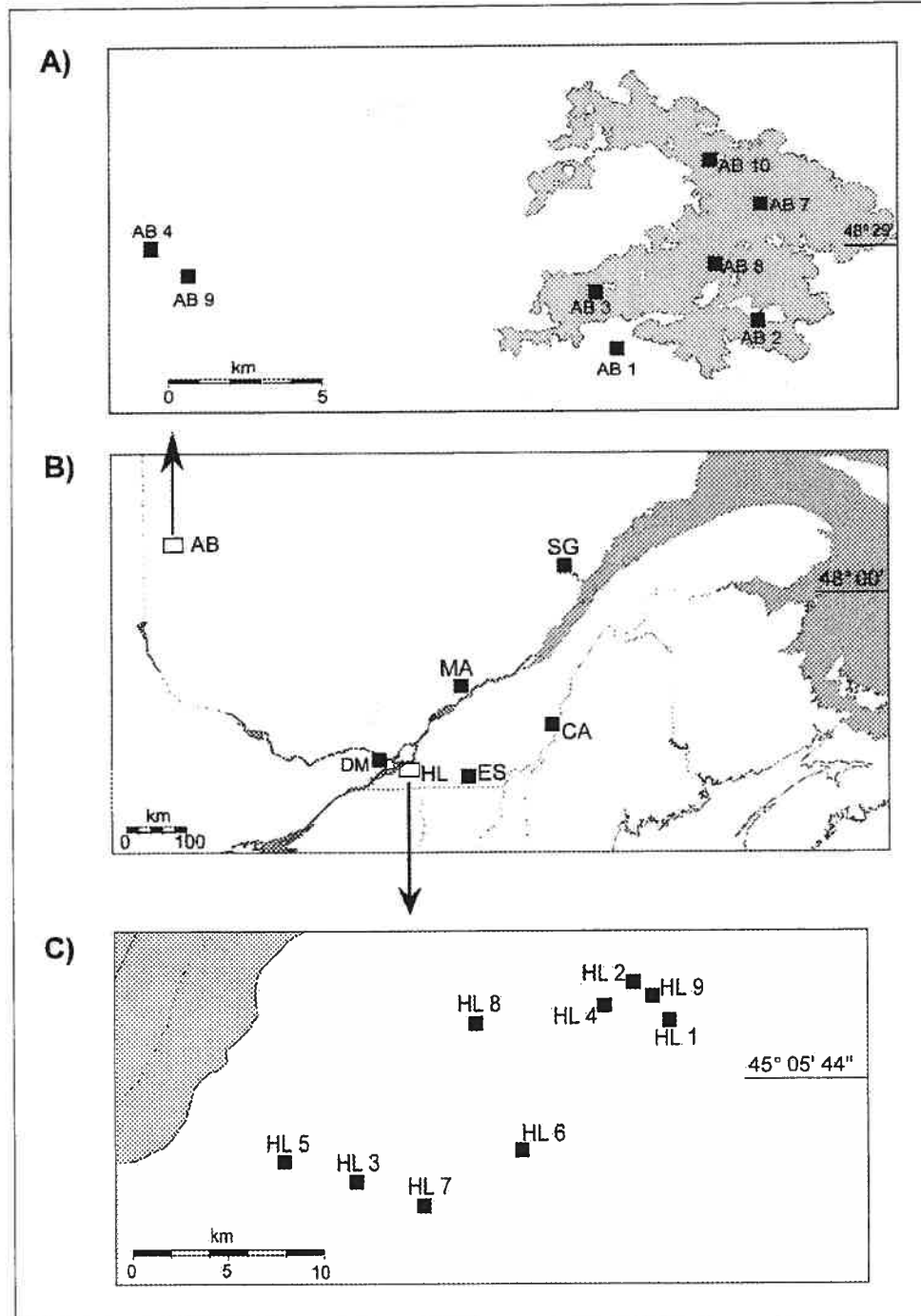


Figure 3.1 (A) Close-up of Abitibi region showing locations where *Cuterebra* were sampled. (B) Map of Québec showing the seven populations where *Cuterebra* were sampled. (C) Close-up of Haut St-Laurent region showing locations where *Cuterebra* were sampled. AB: Abitibi, DM: Deux-Montagnes, ES: Estrie, CA: Chaudière-Appalaches, HL: Haut St-Laurent, MA: Mauricie, SG: Saguenay.

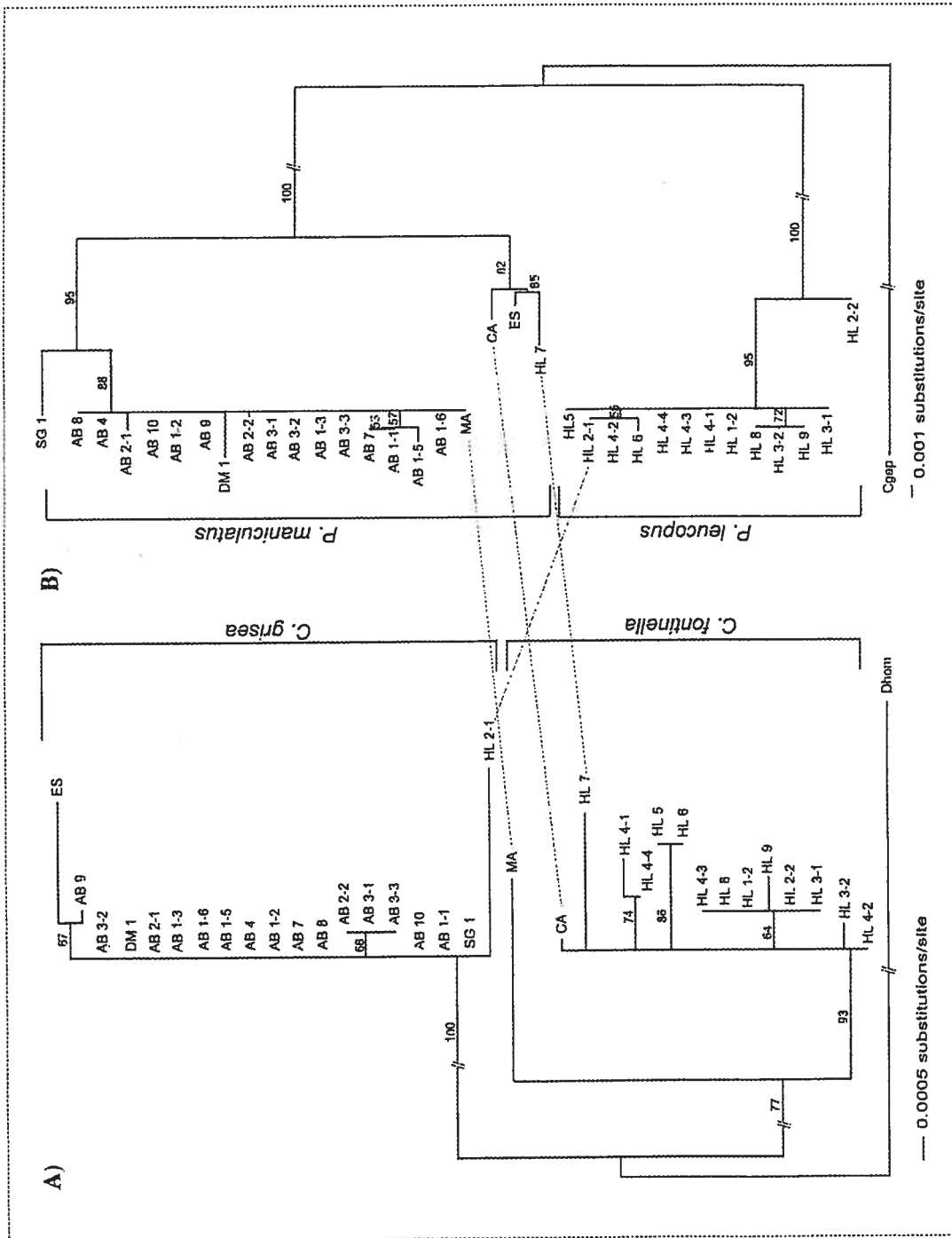


Figure 3. 2 (A) Neighbor-joining tree of *Cuterebra* based on the total-evidence analysis of COI, COII and COIII sequences. (B) Neighbor-joining tree of *Peromyscus* estimated from COII sequences. Number above branches indicate bootstrap support values (nodes with <50% bootstrap support were collapsed). A line between host and parasite is indicative of a mismatch according to host-specificity hypothesis. Names of specimens refer to abbreviations used in Figure 3.1.

Cuterebra larvae extracted from the Woodland Jumping Mouse, the Southern Red-backed Vole and the Eastern Chipmunk were also sequenced for identification purposes, and sequences have been deposited in GenBank under accession numbers AY507163–AY507165, AY507224–AY507228. All specimens grouped either with *C. grisea* or *C. fontinella*, and were thus identified accordingly. Of the four larvae collected in Southern Red-backed Voles, three have been identified as *C. grisea* and one as *C. fontinella*. The larva associated with the Eastern Chipmunk is a *C. fontinella*, whereas that associated with the Woodland Jumping Mouse is a *C. grisea*. This study represents the first record of such host species for these two *Cuterebra* species.

3.5.2 *Cuterebra* sequences

Sequences could be obtained for 34 of the 49 *Cuterebra* specimens extracted from *Peromyscus*. Amplification failure may be explained by DNA degradation for specimens collected in snap traps that had been dead for a couple of hours. Moreover, first and second instar larvae contain enzymes that could impair DNA extraction (Otranto *et al.* 2003). COI, COII and COIII sequences were obtained for 32, 26 and 34 individuals, respectively. All sequences were consistent with previous identification made with species-specific primers and have been deposited in GenBank under accession numbers AY507157–AY507193, AY507196–AY507221, AY507223–AY507262.

Unambiguous sequences obtained ranged from 437 bp to 1447 bp. For *C. grisea*, 17 sites were polymorphic (1.2%), and a single position was parsimony informative (0.1%). For *C. fontinella* 27 sites were variable (1.8%), including eight parsimony informative positions (0.5%). Details of the sequence length and the number of polymorphic and informative sites for each gene are presented in Table 3-II.

Table 3-II Sequence lengths, number of variable sites, and number of informative sites of the mitochondrial genes sequenced in this study, for host and parasite species.

Gene	Species	n	Length (bp)	Variable Sites	Informative sites
COI	<i>C. grisea</i>	18	210-454	3 (0.6 %)	0 (0.0%)
	<i>C. fontinella</i>	14	385-458	7 (1.5 %)	2 (0.4%)
COII	<i>C. grisea</i>	13	185-552	9 (1.6 %)	0 (0.0%)
	<i>C. fontinella</i>	13	491-556	10 (1.8 %)	3 (0.5%)
COIII	<i>C. grisea</i>	19	196-432	5 (1.1 %)	1 (0.2%)
	<i>C. fontinella</i>	15	406-435	10 (2.3 %)	3 (0.7%)
COI+II+III	<i>C. grisea</i>	19	437-1436	17 (1.2 %)	1 (0.1%)
	<i>C. fontinella</i>	15	860-1447	27 (1.9 %)	8 (0.6%)
COIII	<i>P. maniculatus</i>	21	558-682	32 (4.7 %)	17 (2.5%)
	<i>P. leucopus</i>	13	500-688	10 (1.5 %)	2 (0.3%)

Estimation of θ_s and θ_π for all genes combined were higher in *C. fontinella* ($\theta_s = 8.30$, SD = 3.34; $\theta_\pi = 5.04$, SD = 2.91) than in *C. grisea* ($\theta_s = 4.86$, SD = 1.99; $\theta_\pi = 1.51$, SD = 1.06). The number of fixed differences between species for COI, COII and COIII was 6, 1 and 6 respectively, for a total of 13 fixed differences (0.9%). Base composition was similar in all genes, with a proportion of A-T ranging from 67 to 73%, which is consistent with values obtained for other species of Diptera (Lessinger *et al.* 2000).

3.5.3 *Peromyscus* sequences

Mice sequences were obtained for the 34 corresponding parasites. These sequences have been deposited in GenBank under accession numbers AY513970-AY514004. Unambiguous sequences obtained ranged in length from 500 bp to 688 bp. For *P. maniculatus*, 32 sites were polymorphic (4.7%), and 17 were parsimony informative (2.5%). For *P. leucopus*, 10 sites were polymorphic (1.5%), and only two positions were informative (0.3%) (Table 3-II).

Estimation of θ_s and θ_π were higher for *P. maniculatus* ($\theta_s = 8.89$, SD = 3.30; $\theta_\pi = 5.95$, SD = 3.30) than for *P. leucopus* ($\theta_s = 3.22$, SD = 1.53; $\theta_\pi = 2.17$, SD = 1.44). A total of 57 fixed differences were observed between species of *Peromyscus* (4.7%). The proportion of A-T in *Peromyscus* (60%) was significantly lower than in *Cuterebra* ($t = 9.79$, $p = 0.037$).

3.5.4 Population differentiation and isolation-by-distance

The Mantel test relating genetic distances to a binary population matrix was significant for *P. maniculatus* ($r = 0.72$, $p = 0.001$) and *C. grisea* ($r = 0.51$, $p = 0.027$). The isolation-by-distance model was also significant for *P. maniculatus* ($r = 0.70$, $p = 0.001$) and *C. grisea* populations ($r = 0.43$, $p = 0.022$). The tests for *P. leucopus* and *C. fontinella* were not significant.

3.5.5 Effect of the St.Lawrence River

The St.Lawrence River represents a significant factor shaping population structure of *P. maniculatus* ($r = 0.94$, $p = 0.002$) and *C. grisea* ($r = 0.77$, $p = 0.008$). This test was also significant for *C. fontinella* ($r = 0.73$, $p = 0.014$) but relies on a single specimen coming from the North shore. This test could not be performed for *P. leucopus* because all specimens sampled were from the South shore.

3.5.6 Host-parasite relationships among populations

Neighbor-joining trees for the parasites estimated separately for the COI, COII and COIII sequences were very similar and clearly split the two species identified *a priori* with species-specific primers (trees not shown). However, resolution within each species clade was very weak. The CADM test revealed that the distance matrices representing the three different genes were similar enough to be combined ($W = 0.86$ $p = 0.0001$). The resulting total-evidence tree shows a clear separation between *C. grisea* and *C. fontinella*, with high bootstrap support values (Figure 3.2A). However, combining the genes did not increase the resolution within each species clade.

The neighbor-joining tree of hosts species estimated from COIII sequences is presented in Figure 3.2B. The dichotomy corresponding to the two species of mice identified by species-specific primers is supported by high bootstrap values. Interestingly, the tree also separates Deer Mice from North and South (HL 7, ES, CA) shores of the St.Lawrence River.

A significant correlation of genetic distance matrices was observed between *P. maniculatus* and *C. grisea* ($r = 0.57$, $p = 0.039$). This relationship remained significant when controlling for the geographical distances in a partial Mantel test ($r = 0.52$, $p = 0.037$). The comparison of host and parasite trees was also significant for this species pair ($r = 0.68$, $p = 0.001$). All tests involving *P. leucopus* and *C. fontinella* were not significant.

3.6 DISCUSSION

The correlation of genetic structure observed among populations of *P. maniculatus* and *C. grisea* is an indication that their evolutionary histories are not independent. The genetic distances of these species were correlated, despite the differences in evolutionary rate reflected by a larger proportion of polymorphic sites in the mitochondrial sequences of *P. maniculatus*. This faster rate could be due to differences in effective population sizes and generation time of hosts and parasites. Whereas *Cuterebra* produce only one generation per year (Catts 1982), Deer and White-footed Mice can have between two and four litters per year (Forsyth 1999). Also, the high bias towards A-T nucleotides in insect mtDNA (Otranto *et al.* 2003) decreases the possibility of mutations and increases the probability of multiple hits; it could thus be partly responsible for the slower evolutionary rate in *Cuterebra*.

Congruent relationships among populations of hosts and parasites are more likely when the species are in close association (i.e. when host-specificity is high). In this study, *C. grisea* was mainly collected in Deer Mice, but specimens were also obtained from White-footed Mice, Eastern Chipmunks and Woodland Jumping Mice. However, since no rearing experiments were done, it remains unclear whether the collected larvae can complete their development in these species or if they represent aberrant hosts.

The comparison of host and parasite population structure have been addressed in a limited number of papers, and correlated genetic structure has rarely been reported (Nadler *et al.* 1990, Jerome & Ford 2002). This lack of congruence can be explained in some cases by the presence of an intermediate host interfering with the dispersal pattern of parasites (Mulvey *et al.* 1991). In other cases, it is the long distance dispersal of parasites by their subsequent host that may cause incongruence between the population structures (Dybdahl & Lively 1996, Davies *et al.* 1999). Because *Cuterebra* complete their life cycle in a single host, no other organisms are interfering in their relationships with mice. Discrepancies between host and parasite population structure have also been explained by different migration and dispersal patterns (Michakalis *et al.* 1993, Martinez *et al.* 1999). In the case of the Deer

Mouse and *C. grisea*, comparison of dispersal patterns is not possible because no study has yet examined the dispersal of *Cuterebra*.

When genetic distances are correlated in populations of hosts and parasite, the geographical constraints can be more important than the host structure in determining genetic distances of parasites (Dybahl & Lively 1996). In the present study, genetic distances of the *P. maniculatus* and *C. grisea* could both be explained by isolation-by-distance model. However, the partial Mantel test revealed that this correlation remains significant when controlling for geographical distances. Consequently, the genetic distances of *C. grisea* are more likely to be driven by the population structure of hosts, rather than by geographical distances.

Similar relationships among populations of hosts and parasites are not necessarily an indication of a joint evolution as the influence of biogeography may produce similar patterns (Huelsenbeck *et al.* 2003). Indeed, host and parasites may have been affected by the same biogeographical events, such that their similar phylogeny or genetic structure could be explained by the consequences of living in the same area rather than being the result of their close ecological association (e.g. Humphries *et al.* 1985). Populations of Deer Mouse and *C. grisea* from the North shore of the St. Lawrence River were shown to be different from populations from the South shore. A proposed explanation is the postglacial recolonization of areas separated by a geographical barrier, namely the St. Lawrence River, by founders coming from different refugia; a similar pattern as that observed in the rainbow smelt (*Osmerus mordax*) (Bernatchez 1997). This would have established a clear distinction between mice and *Cuterebra* populations located on each shore, and the St. Lawrence River could still represent an important barrier maintaining this North / South dichotomy.

Deer Mice can swim across aquatic barriers for up to 230 m, in the absence of swirl, if they can see land on the other side (Sheppe 1965). Because the St. Lawrence River represents a fast, large, and choppy River, it seems improbable that Deer Mice can cross this barrier. Moreover, winter dispersal over the frozen river is unlikely since dispersal rarely occurs in

winter months (Fairbain 1978). On the other hand, *Cuterebra* are large flies with a powerful flight (Wood 1981). Dispersal distances of *Cuterebra* are unknown but it has been shown that a related species of Oestridae parasitising the Reindeer (*Rangifer tarandus*) can fly up to 900 km and can travel 40 km in a period of 35 hours (Nilssen & Anderson 1995). St. Lawrence River is therefore likely not a barrier for *C. grisea*. Hence, some evolutionary constraints should maintain the North / South population differentiation of parasites in the absence of a geographical barrier.

We suggest that selection of parasites locally adapted to host populations maintains the historical structure in *C. grisea*, leading to coevolution of hosts and parasites populations. Even though coevolutionary interaction of hosts and parasites have been examined mostly between species (e.g. Holmes 1983, Traub 1985, Hafner & Nadler 1988, Moran & Baumann 1994, Hafner & Page 1995, Weiblen & Bush 2002) it can also be studied at a lower taxonomic scale (Nadler 1995, Thompson 1998). Therefore, the genetic population structure of parasites should reflect the structure of their hosts, in the same way as parasite phylogeny echoes the host phylogeny when cospeciation occurs (Mitter & Brooks 1983). Previous papers have shown that discrepancies between host and parasite population structure are more common than congruence. In the present study, we have detected a significant correlation of population structure for *P. maniculatus* and *C. grisea*, providing a rare evidence for possible intraspecific coevolution.

3.7 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank R. Charest, J. Jutras, G. Lupien and D. St-Hilaire from the Société de la faune et des parcs du Québec (FAPAQ) for providing mice and P.-A. Landry and P. Girard for collecting *Cuterebra* larvae in wild mice. Thanks also to Guy Fitzgerald from the Clinique des oiseaux de proie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal for providing a *Cuterebra* specimen extracted from a domestic chipmunk. We would also like to thank members of the Laboratoire d'écologie moléculaire et évolution (LEMEE) for technical support in the field and the lab. This work was supported by

scholarships from the Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) and from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) to S. Noël and by CRSNG grants to B. Angers and F.-J. Lapointe.

CHAPITRE 4

CONCLUSION

4.1 IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES CUTÉRÈBRES

Le premier objectif de mes travaux de maîtrise était d'identifier des marqueurs moléculaires permettant de distinguer *C. grisea* de *C. fontinella*. Un tel projet était motivé par la difficulté d'identification de ces espèces. Tout d'abord, il est pratiquement impossible d'identifier morphologiquement les larves de cutérèbres, ce qui était problématique dans mon cas puisque tous les spécimens à ma disposition pour l'étude de coévolution étaient des larves. De plus, la validité des caractères morphologiques couramment utilisés pour distinguer les adultes est remise en question par l'existence de formes intermédiaires, ce qui a donné lieu à de nombreuses spéculations : *C. grisea* et *C. fontinella* sont-elles réellement des espèces distinctes? Y a-t-il hybridation? Chaque espèce possède-t-elle les gènes lui permettant de produire les colorations de l'autre espèce?

Les deux techniques développées ont permis d'identifier correctement tous les spécimens dont l'identification avait été réalisée préalablement par séquençage et se sont donc avérées très fiables. À l'aide des marqueurs développés, il est dorénavant possible d'identifier avec certitude les adultes et les larves de *C. grisea* et de *C. fontinella*. Toutefois, les marqueurs moléculaires furent créés uniquement pour distinguer ces deux espèces, sans tenir compte de la variabilité génétique des autres espèces de cutérèbres. Il est donc possible que celles-ci soient identifiées avec les marqueurs développés comme étant des *C. grisea*, des *C. fontinella*, ou peut-être que les marqueurs ne fonctionneraient tout simplement pas. Puisque l'information génétique n'est pas disponible pour les autres espèces de cutérèbres, il est pour l'instant impossible de prédire le patron qui serait obtenu avec les marqueurs développés.

Les marqueurs ont également été employés avec des spécimens de musée qui ont été préalablement identifiés morphologiquement. Pour certains individus, l'identification génétique ne correspond pas à l'identification basée sur des caractères morphologiques, ce qui soulève d'une part la question de l'hybridation. Pour vérifier l'hypothèse d'hybridation, on compare habituellement l'identification obtenue par des marqueurs nucléaires transmis

biparentalement et des marqueurs mitochondriaux qui sont transmis maternellement chez les cutérèbres (e.g. Stevens *et al.* 2002). Malgré de nombreux efforts, l'identification de *C. grisea* et *C. fontinella* avec des gènes nucléaires n'a pu être réalisée lors de ce projet. Des difficultés d'amplification et de séquençage, entre autres pour les introns ITS1 et ITS2, ainsi que le manque de variabilité dans un des fragments séquencés (le domaine D3 du gène ribosomal 28S) ont freiné la progression de cet aspect de mon projet qui a dû être abandonné, faute de temps.

Au cours de l'élaboration des marqueurs spécifiques, le séquençage d'une trentaine de cutérèbres fut réalisé et a permis d'éclaircir les relations entre *C. grisea* et *C. fontinella*. L'analyse phylogénétique réalisée a montré une séparation nette entre deux groupes, l'un rassemblant pour la plupart les cutérèbres provenant de la rive nord du St-Laurent et retrouvés dans la souris sylvestre (*Peromyscus maniculatus*), alors que l'autre groupe rassemblait des spécimens de la rive sud retrouvés en grande partie dans la souris à pattes blanches (*P. leucopus*). En raison de leur provenance géographique et de leur hôte, ces spécimens furent identifiés comme étant des *C. grisea* et des *C. fontinella*, respectivement. Il apparaît donc clair qu'il existe deux espèces, ou encore sous-espèces, distinctes et que *C. grisea* et *C. fontinella* ne forment pas une seule entité génétique.

4.2 COÉVOLUTION

Le deuxième volet de mon mémoire aborde la question de la coévolution des populations des cutérèbres et de leurs hôtes, les souris du genre *Peromyscus*. La congruence observée entre la structure génétique des populations de la souris sylvestre et de son parasite, *C. grisea*, montre que l'évolution des populations de ces espèces d'hôtes et de parasites se fait conjointement, un résultat rarement observé chez d'autres organismes.

Toutefois, aucune similarité n'a été remarquée entre la structure des populations de l'autre paire étudiée, soit la souris à pattes blanches et *C. fontinella*. Ce résultat pourrait être attribuable à la petite échelle géographique impliquée. En effet, des spécimens parasités de

souris à pattes blanches n'ont été retrouvés qu'à l'intérieur de la MRC du Haut St-Laurent où la distance maximale entre deux localités échantillonnées était de 22 km. À cette échelle, aucune différenciation des populations de souris ni de cutérèbres n'a pu être observée. Toutefois, les spécimens provenaient d'îlots forestiers séparés par des terres agricoles. La fragmentation de l'habitat pouvant réduire le flux génique entre les populations, on aurait donc pu s'attendre à observer une différenciation des populations, malgré les faibles distances entre les populations. Une étude similaire dans un habitat fragmenté a d'ailleurs démontré que des populations séparées de 500 m étaient différentes (Mossman & Waser 2001). Cette étude ayant été réalisée avec des microsatellites qui sont des marqueurs très variables, il est donc possible que les marqueurs utilisés, plutôt que l'échelle géographique, soient responsables de l'absence de résultats significatifs en ce qui concerne la souris à pattes blanches et *C. fontinella*. Il serait intéressant de tester cette hypothèse et d'évaluer la présence de coévolution à une échelle microgéographique chez les deux paires d'espèces étudiées. En ce qui concerne la souris sylvestre et *C. grisea*, cette étude pourrait être réalisée en Abitibi avec les population des îles du lac Duparquet où la différenciation des populations de souris a déjà été établie (Landry & Lapointe 1999, Landry *et al.* 2003).

Au cours de ce projet, la principale difficulté rencontrée fut la rareté des cutérèbres. Puisque ceux-ci sont très rarement observés en nature (Wood 1981), il est impensable de les capturer directement et il est nécessaire de les extraire de souris parasitées. Le taux de parasitisme étant très variable d'une région à l'autre, la recherche de cutérèbres s'avère donc une aventure hasardeuse. Bien que plus de 1300 souris aient été examinées, uniquement 55 parasites ont été retrouvés, ce qui constitue un maigre 4% d'incidence moyenne. Toutefois, ce faible nombre d'individus n'a pas empêché la réalisation du projet de recherche puisque des résultats significatifs ont tout de même pu être obtenus.

4.3 BILAN ET RECHERCHES FUTURES

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de recherche ont contribué à l'avancement des connaissances à plusieurs niveaux. D'un point de vue pratique, les marqueurs

moléculaires développés permettent dorénavant l'identification fiable des larves ainsi que des adultes de *C. grisea* et *C. fontinella*. Il a également été établi que ces deux espèces forment deux entités génétiques distinctes. Le volet portant sur la coévolution représente la première étude phylogéographique des *Cuterebra* mais surtout, il s'agit de l'une des rares études où une corrélation entre la structure des populations d'hôtes et de parasites a été obtenue, contribuant ainsi à une meilleure compréhension des processus de coévolution.

Les résultats obtenus procurent plusieurs avenues de recherches futures possibles. Tout d'abord, des marqueurs permettant l'identification d'autres espèces de cutérèbres élargiraient la portée de cette technique. Puisque l'hybridation entre *C. fontinella* et *C. grisea* n'a pu être testée, cette problématique reste entière. De plus, l'identification moléculaire de spécimens de musée a soulevé l'hypothèse que ce que nous appelons *C. grisea* à l'est du Canada soit différent de l'espèce-type qui a été décrite en Colombie-Britannique. Si des études taxonomiques futures et le réexamen des spécimens-types confirment cette hypothèse, il faudra alors trouver un nouveau nom pour la population de l'est.

Finalement, en plus d'étudier la coévolution intraspécifique à une échelle microgéographique, il serait également intéressant d'étudier la coévolution chez les cutérèbres à un niveau taxonomique supérieur. Le genre *Cuterebra* comprend plus de 80 espèces qui semblent avoir évolué en parallèle avec différentes lignées de rongeurs (Catts 1982); il s'agit donc d'un groupe taxonomique fort approprié pour tester des hypothèses de cospéciation et de coévolution.

RÉFÉRENCES

- Althoff DM & Thompson JN (1999) Comparative geographic structures of two parasitoid-host interactions. *Evolution* **53** : 818-825.
- Amicucci A, Zambonelli A, Giomaro G, Potenza L & Stocchi V (1998) Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Molecular Ecology* **7** : 273-277.
- Anderson S & Jones JK (1984) Introduction. Dans : *Order and families of recent mammals of the world* (ed. Anderson S & Jones JK), pp.1-10. John Wiley & Sons, New York.
- Aquadro CF & Patton JC (1980) Salivary amylase variation in *Peromyscus*: use in species identification. *Journal of Mammalogy* **61** : 703-707.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18** : 489-522.
- Avise JC (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, London.
- Azeredo-Espin AML, Schroeder RFW, Huettel MD, Sheppard WS (1991) Mitochondrial DNA variation in geographic populations of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Experientia* **47** : 483-485.
- Barrett JA (1985) Host-parasite interactions and systematics. Dans : *Coevolution and systematics* (ed. Stone AR & Hawksworth DL), Clarendon Press, New York.
- Bernatchez L (1997) Mitochondrial DNA analysis confirms the existence of two glacial races of rainbow smelt *Osmerus mordax* and their reproductive isolation in the St Lawrence River estuary (Québec, Canada). *Molecular Ecology* **6** : 73-83.
- Blair WF (1950) Ecological factors in speciation of *Peromyscus*. *Evolution* **4** : 253-275.
- Blomster J, Hoey EM, Maggs CA & Stanhope MJ (2000) Species-specific oligonucleotide probes for macroalgae: molecular discrimination of two marine fouling species of *Enteromorpha* (Ulvophyceae). *Molecular Ecology* **9** : 177-186.
- Boonstra R, Krebs CJ & Beacham TD (1980) Impact of botfly parasitism on *Microtus townsendii* populations. *Canadian Journal of Zoology* **58** : 1683-1692.

- Bowers JH, Baker RJ & Smith MH (1973) Chromosomal, electrophoretic, and breeding studies of selected populations of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and black-eared mice (*P. melanotis*). *Evolution* **27** : 378-386.
- Bowman J (2000) Forest components associated with parasitism of small mammals by botflies (*Cuterebra*). *Mammalia* **64** : 243-247.
- Brooks DR (1979) Testing the context and extent of host-parasite coevolution. *Systematic Zoology* **28** : 299-307.
- Casgrain P (2003) Multiple regression over distance, ultrametric and additive matrices with permutation test. Département de sciences biologiques, Université de Montréal.
- Casgrain P & Legendre P (2001) The R Package for multivariate and spatial analysis, version 4.0 d5 user's manual. Département de sciences biologiques, Université de Montréal.
- Catts EP (1982) Biology of New World Bot flies: Cuterebridae. *Annual Review of Entomology* **27** : 313-338.
- Choate JR (1973) Identification and recent distribution of White-Footed Mice (*Peromyscus*) in New England. *Journal of Mammalogy* **54** : 41-49.
- Chomczynski P, Mackey K, Drews R & Wilfinger W (1997) DNAzol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques* **22** : 550-553.
- Clark BK & Kaufman DW (1990) Prevalence of botfly (*Cuterebra* sp.) parasitism in populations of small mammals in eastern Kansas. *American Midland Naturalist* **124** : 22-30.
- Collette BB & Russo JL (1985) Interrelationships of the Spanish Mackerels (Pisces: Scombridae: *Scomberomorus*) and their copepod parasites. *Cladistics* **1** : 141-158.
- Colwell DD, Baird CR, Lee B & Milton K (1999) Scanning electron microscopy and comparative morphometrics of eggs from six bot fly species (Diptera : Oestridae). *Journal of Medical Entomology* **36** : 803-810.
- Conroy CJ & Cook JA (2000) Phylogeography of a post-glacial colonizer: *Microtus longicaudus* (Rodentia: Muridae). *Molecular Ecology* **9** : 165-175.
- Corbet GB & Hill JE (1991) *A world list of mammalian species*. Oxford University Press, New York.

- Crawley H (1923) *Cuterebra cuniculi* in the dog (Diptera: Oestridae). *Entomological News* **34** : 315.
- Crozier RH, Crozier YC & Mackinlay AG (1989) The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution* **6** : 399-411.
- Davies CM, Webster JP, Krüger O, Munatsi A, Ndamba J & Woolhouse MEJ (1999) Host-parasite population genetics : a cross sectional comparison of *Bulinus globussus* and *Schistosoma haematobium*. *Parasitology* **119** : 295-302.
- Dean MD & Ballard JWO (2001) Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **98** : 279-283.
- Delmotte F, Bucheli E & Shykoff JA (1999) Host and parasite population structure in a natural plant-pathogen system. *Heredity* **82** : 300-308.
- Dunaway PB, Payne JA, Lewis LL & Story JD (1967) Incidence and effects of *Cuterebra* in *Peromyscus*. *Journal of Mammalogy* **48** : 38-51.
- Dybahl MF & Lively CM (1996) The geography of coevolution: comparative population structures for a snail and its trematode parasite. *Evolution* **50** : 2264-2275.
- Ehrlich PR & Raven PH (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* **18** : 586-608.
- Fairbairn DJ (1978) The spring decline in deer mice: death or dispersal? *Canadian Journal of Zoology* **55** : 84-92.
- Fanello C, Santolamazza F & della Torre A (2002) Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology* **16** : 461-464.
- Feinsinger P (1983) Coevolution and pollination. Dans: *Coevolution* (ed. Futuyma DJ & Slatkin M), pp.282-310. Sinauer Associates, Sunderland.
- Forsyth A (1999) *Mammals of North America: temperate and arctic regions*. Firefly Books, Willowdale.
- Frank SA (1993) Specificity versus detectable polymorphism in host-parasite genetics. *Proceedings of the Royal Society of London B* **254** : 191-197.

- Furrer RK (1973) Homing of *Peromyscus maniculatus* in the channelled scablands of East-Central Washington. *Journal of Mammalogy* **54** : 466-482.
- Gaines MS, McClenahnam LR Jr & Rose RK (1978) Temporal patterns of allozymic variation in fluctuating populations of *Microtus ochrogaster*. *Evolution* **32** :723-739.
- Galindo-Leal C (1997) Infestation of rock mice (*Peromyscus difficilis*) by botflies: ecological consequences of differences between sexes. *Journal of Mammalogy* **78** : 900-907.
- Gandon S, Capowiez Y, Dubois Y, Michalakis Y & Olivieri I (1996) Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **263** : 1003-1009.
- George WA Jr & Bradshaw WN (1968) Karyotype studies in *Peromyscus leucopus noveboracensis* (Fisher). *West Virginia Academy of Science* **40** : 140-146.
- Geurgas SR, Infante-Malachias ME & Azeredo-Espin AML (2000) Extreme mitochondrial variability and lack of genetic structure in populations of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) from Brazil. *Annals of the Entomological Society of America* **93** : 1085-1094.
- Goertz JW (1966) Incidence of warbles in some Oklahoma rodents. *American Midland Naturalist* **75** : 242-245.
- Hafner MS & Nadler SA (1988) Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts. *Nature* **332** : 258-259.
- Hafner MS & Page RDM (1995) Molecular phylogenies and host-parasite cospeciation: gophers and lice as a model system. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* **349** : 77-83.
- Hafner MS, Sudman PD, Villablanca FX, Spradling TA, Demastes JW & Nadler SA (1994) Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science* **265** :1087-1090.
- Hall ER & Kelson KR (1959) *The mammals of North America*. Ronald Press, New York.
- Harris D, Rogers DS & Sullivan J (2000) Phylogeography of *Peromyscus furvus* based on cytochrome b sequence data. *Molecular Ecology* **9** : 2129-2135.
- Hart JA (1988) Rust fungi and host plant coevolution: Do primitive hosts harbor primitive parasites? *Cladistics* **4** : 339-366.

- Holmes JC (1983) Evolutionary relationships between parasitic helminths and their hosts. Dans : *Coevolution* (ed. Futuyma DJ & Slatkin M), pp.161-185. Sinauer associates, Sunderland.
- Hooper ET (1968) Classification. Dans : *Biology of Peromyscus* (ed. King JA), pp.27-74. American Society of mammalogists, Stillwater.
- Howard WE (1949) Dispersal, amount of inbreeding, and longevity in a population of prairie deermice on the George reserve, southern Michigan. *Contributions from the Laboratory of Vertebrate Genetics* 43 : 1-50.
- Huelsensbeck JP, Rannala B & Larget B (2003) A statistical perspective for reconstructing the history of host-parasite associations. Dans : *Tangled trees: Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution* (ed. Page RDM), pp.93-119. The University of Chicago Press, Chicago.
- Humphries CJ, Cox JM & Nielsen ES (1985) *Nothofagus* and its parasites: a cladistic approach to coevolution. Dans : *Coevolution and systematics* (ed. Stone AR & Hawksworth DL), pp.55-76. Oxford University Press, New York.
- Hunter DM (1973) The biology of the botfly *Cuterebra grisea*, (Diptera: Cuterebridae) infesting deermice (*Peromyscus maniculatus*). Mémoire de maîtrise, Simon Fraser University.
- Hunter DM & Webster JM (1973a) Aggregation behavior of adult *Cuterebra grisea* and *C. tenebrosa* (Diptera: Cuterebridae). *Canadian Entomologist* 105 : 1301-1307.
- Hunter DM & Webster JM (1973b) Determination of the migratory route of botfly larvae, *Cuterebra grisea* (Diptera: Cuterebridae) in deermice. *International Journal for Parasitology* 3 : 311-316.
- Hunter DM & Webster JM (1974) Effects of cuterebrid larval parasitism on deer-mouse metabolism. *Canadian Journal of Zoology* 52 : 209-217.
- Hunter DM, Sadleir MFS & Webster JM (1972) Studies on the ecology of cuterebrid parasitism in deermice. *Canadian Journal of Zoology* 50 : 25-29.
- Innis MA & Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. *PCR protocols: A guide to methods and applications* (ed. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ), pp. 3-12. Academic Press, San Diego.
- Janzen DH (1980) When is it coevolution? *Evolution* 34 : 611-612.

- Jarne P & Theron A (2001) Genetic structure in natural population of flukes and snails: a practical approach and review. *Parasitology* **123** : s27-s40.
- Jerome CA & Ford BA (2002) Comparative population structure and genetic diversity of *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) and its *Pinus* host species : insight into host-parasite evolution in parasitic angiosperms. *Molecular Ecology* **11** : 407-420.
- Jobet E, Durand P, Langand J, Müller-Graf CDM, Hugot J-P, Bougnoux M-E, Rivault C, Cloarec A & Morand S (2000) Comparative genetic diversity of parasites and their hosts : population structure of an urban cockroach and its haplo-diploid parasite (oxyuroid nematode). *Molecular Ecology* **9** :481-486.
- Jukes TH & Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. Dans : *Mammalian Protein Metabolism* (ed. Munro HN), pp.21-132. Academic Press, New York.
- Junqueira ACM, Lessinger AC & Azeredo-Espin AML (2002) Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Medical & Veterinary Entomology* **16** : 39-45.
- Keth AC (1999) Three incidents of human myiasis by rodent *Cuterebra* (Diptera:Cuterebridae) larvae in a localized region of western Pennsylvania. *Journal of Medical Entomology* **36** : 831-832.
- Landry P-A (2000) Effets de la configuration du paysage sur la variabilité génétique de populations de souris sylvestres (*Peromyscus maniculatus*). Thèse de doctorat, Université de Montréal.
- Landry P-A & Lapointe F-J (1999) The genetic heterogeneity of deer mouse populations (*Peromyscus maniculatus*) in an insular landscape. *Researches in Population Ecology* **41** : 263-268.
- Landry P-A, Noël S, Tessier N & Lapointe F-J (2003) Landscape-dependent differentiation of deer mouse populations (*Peromyscus maniculatus*): a total-evidence approach using molecular and morphometric data. Dans : *Rats, mice and people: rodent biology and management* (ed. Singleton GR, Hinds LA, Krebs CJ & Sprat DM), ACIAR Monograph No. 96.
- Lapointe F-J & Cucumel G (1997) The average consensus procedure: combination of weighted trees containing identical or overlapping sets of taxa. *Systematic Biology* **46** : 306-312.
- Lapointe F-J & Legendre P (1992) A statistical framework to test the consensus among additive trees (cladograms). *Systematic Biology* **41** :158-171.

- Legendre P & Lapointe FJ (2004) Assessing the congruence among distance matrices: single malt Scotch whiskeys revisited. *Australian and New Zealand Journal of Statistics*. (in press).
- Lessinger AC & Azeredo-Espin AML (2000) Evolution and structural organisation of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology* **14** : 71-80.
- Lessinger AC, Martins Junqueira AC, Lemos TA, Kemper EL, da Silva FR, Vettore AL, Arruda P & Azeredo-Espin (2000) The mitochondrial genome of the primary screw worm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera : Calliphoridae). *Insect Molecular Biology* **9** :521-529.
- Lin YS, Poh YP, Lin SM & Tzeng CS (2002) Molecular techniques to identify freshwater eels: RFLP analyses of PCR-amplified DNA fragments and allele-specific PCR from mitochondrial DNA. *Zoological Studies* **41** : 421-430.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27** : 209-220.
- Martinez JG, Soler JJ, Moler AP & Burke T (1999) Comparative population structure and gene flow of a brood parasite, the great spotted cuckoo (*Clamator glandarius*) and its primary host, the magpie (*Pica pica*). *Evolution* **53** : 269-278.
- May RM & Anderson RM (1983) Parasite-host coevolution. Dans : *Coevolution* (ed. Futuyma DJ & Slatkin M), pp.186-206. Sinauer associates, Sunderland.
- McKenna MC & Bell SK (1997) *Classification of mammals above the species level*. Columbia University Press, New York.
- Michalakis Y, Sheppard AW, Noel V & Olivieri I (1993) Population structure of a herbivorous insect and its host plant on a microgeographic scale. *Evolution* **47** : 1611-1616.
- Michaux J, Reyes & Catzefflis F (2001) Evolutionary history of the most speciose mammals : molecular phylogeny of muroid rodents. *Molecular Biology and Evolution* **18** : 2017-2031.
- Michaux JR, Kinet S, Filippucci MG, Libois R, Besnard A & Catzefflis F (2001) Molecular identification of three sympatric species of wood mice (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. alpicola*) in western Europe (Muridae : Rodentia). *Molecular Ecology Notes* **1** : 260-263.

- Miller DH & Getz LL (1969) Botfly infection in a population of *Peromyscus leucopus*. *Journal of Mammalogy* **50** : 277-283.
- Mitter C & Brooks DR (1983) Phylogenetic aspects of coevolution. Dans : *Coevolution* (ed. Futuyma DJ & Slatkin M), pp.65-98. Sinauer Associates, Sunderland.
- Mitton JB (1994) Molecular approaches to population biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25** : 44-69.
- Moody PA (1941) Identification of mice in genus *Peromyscus* by a red blood cell agglutination test. *Journal of mammalogy* **22** : 40-47.
- Moran N & Baumann P (1994) Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganisms of arthropods. *Trends in Ecology and Evolution* **9** : 15-20.
- Moritz C, Dowling TE & Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18** : 269-292.
- Mossman CA & Waser PM (2001) Effects of habitat fragmentation on population genetic structure in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Canadian Journal of Zoology* **79** : 285-295.
- Mulvey M, Aho JM, Lydeard C, Leberg PL & Smith MH (1991) Comparative population structure of a parasite (*Fascioloides magna*) and its definitive host. *Evolution* **45** : 1628-1640.
- Munger JC & Karasov WH (1991) Sublethal parasites in white-footed mice: impact on survival and reproduction. *Canadian Journal of Zoology* **69** : 398-404.
- Nadler SA (1995) Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *Journal of parasitology* **81** : 395-403.
- Nadler SA, Hafner MS, Hafner JC & Hafner D (1990) Genetic differentiation among chewing louse populations (Mallophage : Trichodectidae) in a pocket gopher contact zone (Rodentia : Geomyidae). *Evolution* **44** : 942-951.
- Noël S, Tessier N, Angers B & Lapointe F-J (2003) Molecular identification of two cryptic species of myiasis-causing flies (*Cuterebra*) by multiplex PCR and RFLP. Accepté dans *Medical & Veterinary Entomology*.
- Nilssen AC & Anderson JR (1995) Flight capacity of the reindeer warble fly, *Hypoderma tarandi*, and the reindeer nose bot fly, *Cephenemyia trompe* (Diptera : Oestridae). *Canadian Journal of Zoology* **73** : 1228-1238.

- Nowack RM & Paradiso JL (1983) *Walker's mammals of the world*. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Otranto D, Traversa D, Guida B, Tarsitano E, Fiorente P & Stevens JR (2003) Molecular characterization of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene of Oestridae species causing obligate myiasis. *Medical & Veterinary Entomology* **17** : 307-315.
- Page RDM (1996) Temporal congruence revisited: comparison of mitochondrial DNA sequence divergence in cospeciating pocket gophers and their chewing lice. *Systematic Biology* **45** : 151-167.
- Pape T (2001) Phylogeny of Oestridae (Insecta: Diptera). *Systematic Entomology* **26** : 133-171.
- Parker MA & Spoerke JM (1998) Geographic structure of lineage associations in a plant bacterial mutualism. *Journal of Evolutionary Biology* **11** : 549-562.
- Parlevliet JE (1985) Coevolution of host resistance and pathogen virulence; possible implications for taxonomy. Dans : *Coevolution and systematics* (ed. Stone AR & Hawksworth DL), pp.19-34. Oxford University Press, New York.
- Payne JA & Cosgrove GE (1966) Tissue changes following *Cuterebra* infestation in rodents. *American Naturalist* **75** : 205-213.
- Peterson RL (1966) *The mammals of eastern Canada*. Oxford university press, Toronto.
- Price PW (1977) General concepts on the evolutionary biology of parasites. *Evolution* **31** : 405-420.
- Price PW (1980) *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press, Princeton.
- Rich SM, Kilpatrick CW, Shipper JL & Crowell KL (1996) Morphological differentiation and identification of *Peromyscus leucopus* and *Peromyscus maniculatus* in northeastern North America. *Journal of Mammalogy* **77** : 985-991.
- Riddle BR (1995) Molecular biogeography in the pocket mice (*Perognathus* and *Chaetodipus*) and grasshopper mice (*Onychomys*): the late cenozoic development of a north american aridlands rodent guild. *Journal of Mammalogy* **76** : 283-301.
- Riddle BR, Hafner DJ & Alexander LF (2000a) Comparative phylogeography of Baileys' pocket mouse (*Chaetodipus baileyi*) and the *Peromyscus eremicus* species group: historical vicariance of the baja California peninsular desert. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **17** : 161-172.

- Riddle BR, Hafner DJ & Alexander LF (2000b) Phylogeography and systematics of the *Peromyscus eremicus* species group and the historical biogeography of north american warm regional deserts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **17** : 145-160.
- Roehrdanz RL (1997) Identification of Tobacco Budworm and Corn Earworm (Lepidoptera, Noctuidae) during early developmental stages by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Annals of the Entomological Society of America* **90** : 329-332.
- Sabrosky CW (1986) *North american species of Cuterebra, the rabbit and rodent bot flies (Diptera: Cuterebridae)*. Entomological Society of america, College Park.
- Safdar N, Young DK & Andes D (2003) Autochthonous furuncular myiasis in the United States: case report and literature review. *Clinical Infectious Diseases* **36** : E73-E80.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Schneider S, Roessli D & Excoffier L (2000) *Arlequin, version 2000. A software for population genetics data analysis*. Genetics and biometry laboratory, University of Geneva.
- Sealander JA (1961) Hematological values in deer mice in relation to botfly infection. *Journal of Mammalogy* **42** : 57-60.
- Sheppe W (1965) Dispersal by swimming in *Peromyscus maniculatus*. *Journal of Mammalogy* **46** : 336-337.
- Shiffer CN (1983) Aggregation behavior of adult *Cuterebra fontinella* (Diptera: Cuterebridae) in Pennsylvania, USA. *Journal of Medical Entomology* **20** : 365-370.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H & Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87** : 651-701.
- Singh RP & McMillan DB (1966) Karyotypes of three subspecies of *Peromyscus*. *Journal of Mammalogy* **47** : 261-266.
- Smouse PE, Long JC & Sokal RR (1986) Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Biology* **35** : 627-632.

- Song YL, Liu CX, McTeague M, Vu A, Liu JY & Finegold SM (2003) Rapid identification of Gram-positive anaerobic coccal species originally classified in the genus *Peptostreptococcus* by multiplex PCR assays using genus- and species-specific primers. *Microbiology* **149** : 1719-1727.
- Sorci G, Moller AP & Boulinier T (1997) Genetics of host-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution* **12** : 196-200.
- Stevens JR, Wall R & Wells JD (2002) Paraphyly in hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. *Insect Molecular Biology* **11** : 141-148.
- Sullivan J, Arellano E, Rogers DS (2000) Comparative phylogeography of mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *American Naturalist* **155** : 755-768.
- Swofford DL (2002) *PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Thompson JN (1982) *Interaction and coevolution*. John Wiley & Sons, New York.
- Thompson JN (1989) Concepts of coevolution. *Trends in Ecology and Evolution* **4** : 179-183.
- Thompson JN (1998) The population biology of coevolution. *Researches on Population Ecology* **40** :159-166.
- Thompson JN (1999) The evolution of species interactions. *Science* **284** : 2116-2118.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The Clustal-X windows interface - flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25** : 4876-4882.
- Timm RM (1982) Fahrenholz's rule and ressource tracking: a study of host-parasite coevolution. Dans : *Coevolution* (ed. Nitecki MH), pp.225-266. University of Chicago Press, Chicago.
- Timm RM & Cook EF (1979) The effects of bot fly larvae on reproduction in white-footed mice, *Peromyscus leucopus*. *American Midland Naturalist* **101** : 211-217.
- Traub R (1985) Coevolution of fleas and mammals. Dans : *Coevolution of parasitic arthropods and mammals* (ed. Kim KC), pp.295-440. John Wiley & sons, New York.

- Van Horne B (1981) Demography of *Peromyscus maniculatus* in serial stages of coastal coniferous forest. *Ecology* **63** : 992-1003.
- Vogler AP, DeSalle R, Assmann T & Knisley CB (1993) Molecular population genetics of the endangered tiger beetle *Cicindela dorsalis* (Coleoptera: Cicindelidae). *Annals of the Entomological Society of America* **86** : 143-152.
- Wagner DH (2000) Investigation of molecular population genetic substructure in forensically important flies. Thèse de doctorat, University of Alabama.
- Waters JH (1962) Range of *Peromyscus maniculatus* in Southern New England. *Journal of Mammalogy* **43** : 102.
- Wecker SC (1962) The effects of bot fly parasitism on a local population of the white-footed mouse. *Ecology* **43** : 561-565.
- Weiblen GD & Bush GL (2002) Speciation in fig pollinators and parasites. *Molecular Ecology* **11** : 1573-1578.
- Wilson D & Cole FR (2000) *Common names of mammals of the world*. Smithsonian University Press, Washington.
- Wilson DE & Ruff S (1999) *The Smithsonian book of North American mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Wolff JO (1985a) Comparative population ecology of *Peromyscus leucopus* and *Peromyscus maniculatus*. *Canadian Journal of Zoology* **63** : 1548-1555.
- Wolff JO (1985b) The effects of density, food, and interspecific interference on home range size in *Peromyscus leucopus* and *Peromyscus maniculatus*. *Canadian Journal of Zoology* **63** : 2657-2662.
- Wolf M & Batzli GO (2001) Increased prevalence of bot flies (*Cuterebra fontinella*) on white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) near forest edges. *Canadian Journal of Zoology* **79** : 106-109.
- Wood DM (1981) Oestridae. Dans : *Manual of nearctic diptera v.3* (ed. McAlpine JF), pp.1147-1158. Agriculture Canada, Ottawa.
- Zhang D & Hewitt GM (1997) Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology* **25** : 99-120.
- Zumpt F (1965) Myiasis in man and animals in the old world. Butterworths, London.

